Aus der Universitäts-Nervenklinik Marburg an der Lahn
Direktor: Prof. Dr. H. Jacob

Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Extraktionsmethoden auf die Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin-, Gesamtphosphatid-, Sphingomyelin-, Kephalin-, Lecithin- und Lysolecithinausbeute im Liquor cerebrospinalis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Holger Söhngen

aus Erfurt

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Universitäts-Nervenklinik Marburg an der Lahn
Direktor: Prof. Dr. H. Jacob

Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Extraktionsmethoden auf die Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin-, Gesamtphosphatid-, Sphingomyelin-, Kephalin-, Lecithin- und Lysolecithinausbeute im Liquor cerebrospinalis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Holger Söhngen

aus Erfurt

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 22. 2. 1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Prof. Dr. med. O. Schrappe
Correferent: Prof. Dr. rer.nat. F. Zilliken

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinem Vater
in Dankbarkeit

Inhalt

A) Einleitung

I. Das Normallipidspektrum des Liquor cerebrospinalis

II. Bedeutung der Lipiduntersuchungen im Liquor cerebrospinalis

B) Hauptteil

I. Zielsetzung der Arbeit

II. Eigene Untersuchungen

1) Untersuchungsprogramm

2) Erläuterungen zum Untersuchungsschema und Beschreibung der Methoden

III. Ergebnisse

1) Dünnschichtchromatographie

2) Gesamtlipidbestimmung

3) Gesamtcholesterinbestimmung

4) Phosphorbestimmungen

IV. Diskussion

C) Zusammenfassung

D) Anhang

Apparate, Geräte und Reagentien

E) Literaturverzeichnis

Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Extraktionsmethoden auf die Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin-, Gesamtphosphatid-, Sphingomyelin-, Kephalin-, Lecithin- und Lysolecithinausbeute im Liquor cerebrospinalis

A) Einleitung

I. Das Normallipidspektrum des Liquor cerebrospinalis

Seit der Jahrhundertwende sind zahlreiche Untersuchungen über den Lipidgehalt des Liquors veröffentlicht worden. Dennoch mußte TOURTELLOTTE (40) nach kritischem Literaturstudium noch 1958 feststellen, daß bis dahin trotz dieser Anstrengungen ein tieferer Einblick in die Lipidchemie des Liquor cerebrospinalis nicht gewonnen worden war, ja man sich noch nicht einmal auf einheitliche Normalwerte für die bekannten Lipidfraktionen des Liquors geeinigt hatte. Im Mittelpunkt des Interesses stand die quantitative Bestimmung des Gesamtcholesterins und der Gesamtphosphatide in Liquoren von verschiedensten Krankheiten, besonders der Entmarkungskrankheiten, und lediglich diese Lipidfraktionen waren neben dem Glycolipid Cerebrosid als Bestandteile des normalen Liquors bekannt.

Die widersprüchlichen Angaben über das Normallipidmuster des Liquors werden besonders deutlich bei Betrachtung der Normalwerte verschiedener Autoren für

dieses Glycolipid. TOURTELLOTTE (44) (1959) bestimmte diese Fraktion indirekt als "nonphosphorus containing sphingolipid" mit einem Normalwert um 0,059 mg%, entsprechend 5 % der Gesamtlipide. LAFONTAINE (17) (1947) und DIECKHOFF (10) (1957) dagegen gaben für diese Fraktion Normalwerte von 3 - 5 mg% bzw. 700 - 800 mg% an; erheblich differente Werte, liegt doch der erste 2 1/2 mal höher als z.B. der Liquorgesamtlipidbetrag TOURTELLOTTES (44) und der von DIECKHOFF (10) bestimmte sogar höher als der Gesamtlipidgehalt des Serums.

Man hatte sich lange Zeit auf die summarische Erfassung von komplexen Lipidfraktionen, des Gesamtcholesterins bzw. Gesamtphosphatids beschränkt. Erst SELBACH und TRAPPE (35) unternahmen im Jahre 1944 eine differenzierte Untersuchung, nämlich die Fraktionierung des Gesamtcholesterins in die freie und Esterkomponente. Sie fanden nicht nur in allen Liquoren verschiedener neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen eine Gesamtcholesterinerhöhung über den von ihnen angegebenen Normalwert von 0,05 - 0,24 mg%, sondern konnten auch außer in zwei Fällen freies Cholesterin in diesen pathologischen Liquoren nachweisen, machten aber noch keine definitiven Angaben über das Vorkommen von freiem Cholesterin auch im normalen Liquor. So waren noch 1958 POSER und CURRAN (29) überzeugt, daß freies Cholesterin kein Normalbestandteil des Liquors sei, daß dessen Erscheinen im Liquor vielmehr patholo-

gische Vorgänge im Nervensystem widerspiegele, und der Meinung, die Höhe des Betrags an freiem Cholesterin bei der multiplen Sklerose direkt mit der Aktivität und dem Ausmaß der Entmarkung korrelieren zu können. Sie glaubten daher mit der turbidimetrischen Bestimmung des freien Cholesterins nach der Methode von COSTELLO und CURRAN (8) ein wertvolles differentialdiagnostisches und vor allem prognostisches Kriterium in der Hand zu haben.

Erst 1958 gelang TOURTELLOTTE (43) mit Hilfe der modifizierten Methoden von ALBERS und LOWRY (1) sowie von SPERRY und WEBB (36) der definitive Nachweis freien Cholesterins auch im Normalliquor, etwa hundert Jahre nachdem SCHLOSSBERGER (32) 1851 erstmals über den Cholesteringehalt des Liquors berichtet hatte. Nach adaequater Modifikation weiterer Methoden zur Bestimmung der Gesamtlipide sowie der Phosphatide im Liquor konnten TOURTELLOTTE et al. (41) (42) (44) unter Anwendung einer aufwendigen analytischen Prozedur zur Fraktionierung der einzelnen Lipidkomponenten 1959 erstmals das fast vollständige Lipidspektrum des Liquors von 24 Normalfällen präsentieren (Tab. I). Es gelang ihm die Aufschlüsselung der Phospholipide in die Glycerinphosphatide Kephalin und Lecithin und das Sphingosinphosphatid Sphingomyelin sowie der bereits erwähnte Nachweis des freien Cholesterins als eines Normalbestandteils des nicht pathologisch veränderten Liquors. Durch direkte bzw. in-

direkte Bestimmung der einzelnen Fraktionen in der gleichen Liquorprobe konnte er außerdem erstmals den ungefähren Triglyceridgehalt des Normalliquors berechnen.

Tabelle I.

Die Konzentration der verschiedenen Lipidfraktionen im Normalliquor (nach TOURTELLOTTE (44))

Fraktionen	mg%	% des Gesamtlipids
Gesamtlipid	1,254	./.
Neutrallipid	0,403	32
Gesamtphospholipid	0,370	30
Kephalin	0,091	7
Lecithin	0,168	13
Sphingomyelin	0,087	7
Cerebrosid	0,059	5
Gesamtcholesterin	0,415	33
Cholesterinester	0,292	23
freies Cholesterin	0,109	9

Wie in anderen biologischen Flüssigkeiten oder Geweben stellen also auch im Liquor die Lipide ein außerordentlich komplexes Gemisch einzelner Fraktionen dar. Bei vergleichender Analyse der absoluten bzw. relativen Beträge der einzelnen Lipidkomponenten des Liquors mit denen des Serums bzw. der weißen oder grauen Hirnsubstanz stellte TOURTELLOTTE (44) fest, daß zwar die Serumlipide etwa 500 mal konzentrierter sind als die Liquorlipide, daß aber

die prozentuale Verteilung der einzelnen Fraktionen im Liquor derjenigen im Serum sehr viel ähnlicher ist als der in der weißen oder grauen Hirnsubstanz (Tab. II), ein Befund, der u. a. auch von McARDLE und ZILKHA (22) und PHILLIPS und ROBINSON (25) bestätigt wurde und auf welchen in jüngster Zeit CHRISTENSEN LOU und MATZKE (7) wieder hinwiesen.

Tabelle II.

Vergleich der Lipidspektren: Normalliquor, Normalnüchternserum, graue und weiße Hirnsubstanz (nach TOURTELLOTTE (44))

	Liquor		Nüchtern-Serum		Hirnrinde+)		Mark+)	
Fraktionen	mg%	%x)	mg%	%x)	mg/100gxx) F.G.	%	mg/100gxx) F.G.	%x)
Kephalin	0,091	7	18	2	700	12	2.100	12
Lecithin	0,168	13	119	13	1.100	18	1.100	8
Sphingomyelin	0,087	7	42	5	600	10	3.000	17
Gesamt-phospholipid	0,370	30	184	21	3.900	65	7.800	43
Cerebrosid	0,059	5	27	3	1.100	18	5.800	32
Gesamt-cholesterin	0,415	33	180	20	1.000	17	4.500	25
Chol.ester	0,292	23	126	14	0	0	0	0
freies Chol.	0,109	9	54	6	1.000	17	4.500	25
Triglyceride	0,403	32	484	55	0	0	0	0
Gesamtlipid	1,254	./.	876	./.	6.000	./.	18.100	./.

+) Werte nach LE BARON und FOLCH (18)

x) Prozent des Gesamtlipids

xx) mg pro 100 g Frischgewicht

Die Ähnlichkeit der Lipidspektren von Serum und Liquor, die für die Herkunft der normalen Liquorbestandteile von gewisser Bedeutung sein dürfte, x) wird weiter akzentuiert, wenn man wie TOURTELLOTTE (45) die Serum- und Liquorlipidfraktionen zum Proteingehalt in Relation setzt (yLipid/mg Protein). Der erwähnte Faktor 500 vermindert sich dann auf einen Faktor von 2. Bemerkenswert ist weiterhin die Tatsache, daß Serum als auch Liquor Cholesterinester und Triglyceride enthalten, Substanzen, welche dagegen im normalen Hirngewebe vermißt werden.

II. Bedeutung der Lipiduntersuchungen im Liquor cerebrospinalis

Nach den grundlegenden Untersuchungen TOURTELLOTTES, die zu neuen Erkenntnissen über die Lipidchemie des Liquors führten, sind eine Reihe wichtiger Arbeiten veröffentlicht worden. Die Fragestellung hat sich nicht geändert. Man erhofft sich tiefere Einblicke in die Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen, insbesondere der Entmarkungskrankheiten, bei welchen durch den Entmarkungsprozeß in der lipidreichen weißen Substanz beträchtliche Lipidmengen freigesetzt werden. Allgemein ist man der

---

x) Man sollte aber bedenken, daß sich gleiche Lipidklassen durch differente Fettsäureanteile voneinander unterscheiden können.

Meinung, daß diese Vorgänge sich dem Liquor mitteilen und glaubt daher, in diesem relativ einfach zugänglichen biologischen Milieu die Veränderungen in der benachbarten Hirnsubstanz erfassen zu können. Besonders intensiv ist man natürlich um differentialdiagnostische und prognostische Kriterien bemüht. Etwa hinsichtlich einer quantitativen Erfassung der Schwere und des Ausmaßes der Demyelinisation bei der multiplen Sklerose, vor allem wenn diese in stummen Gebieten ohne klinische Zeichen der Progredienz verläuft. TOURTELLOTTE et al. (45) (46) untersuchten Liquoren bei einigen Lipoidosen wie bei der Tay-Sachs'schen Erkrankung, der metachromatischen Leukodystrophie und dem Morbus Niemann-Pick und fanden, daß auch bei diesen Pathothesaurosen das Normallipidspektrum des Liquors alteriert ist; weitere Versuche müssen zeigen, ob solche Untersuchungen zu Kriterien diagnostisch-differentialdiagnostischer Spezifität führen. Nicht zuletzt können solche Lipiduntersuchungen auch Auskunft über die Herkunft der Normalbestandteile des Liquors geben und damit Einblicke in die Funktionen der verschiedenen Schrankensysteme des Cerebrums gewähren. Nach den Untersuchungen von SWAHN et al. (38), McARDLE und ZILKHA (22), ZILKHA und McARDLE (51), TUNA et al. (47) (48), FARSTAD (12), TOURTELLOTTE (45) und anderen Autoren sind Serum, Hirngewebe und weniger auch die weißen Zellen des Liquors an der

Zusammensetzung des Normallipidspektrums beteiligt. Dagegen soll bei bestimmten neurologischen Erkrankungen die eine oder andere Quelle mehr oder weniger dominieren und auf diese Art die Alteration der Normallipidverteilung bewirken.

Einsicht in diese Probleme ist nur von einer detaillierteren Untersuchung, nämlich möglichst rein dargestellter Lipidkonstituenten zu erwarten. Eine summarische Bestimmung des Gesamtcholesterins oder der Gesamtphosphatide kann kaum weiterhelfen. TOURTELLOTTE versuchte diese Fraktionierung des heterogenen Liquorlipidgemisches mit Hilfe einer aufwendigen analytischen Prozedur, die auf selektiver Extraktion beruht. Kein anderer Untersucher hat dieses analytische Schema übernommen. Chromatographische Techniken hatten sich für die Isolierung und Bestimmung einzelner Lipidfraktionen hinsichtlich der einfachen Handhabung und der Trennschärfe ausgezeichnet bewährt. Neben der Säulenchromatographie durch ROBOZ et al. (30) und PAPADOPOULOS et al. (24) hat die Papierchromatographie durch BLOMSTRAND et al. (4), CURTIS und SEIPEL (9), McARDLE und ZILKHA (22) und ZILKHA und McARDLE (51) und in letzter Zeit vor allem die Dünnschichtchromatographie etwa durch PHILLIPS und ROBINSON (25), CHRISTENSEN LOU und MATZKE (7) und PILZ und FRICK (27) im Liquor Anwendung gefunden. Daneben bemühen sich andere Untersucher wie BLOMSTRAND et al. (3), TUNA et al. (47) (48) und FARSTAD (11) (12) (13),

mit Hilfe der Gaschromatographie die prozentuale Verteilung einzelner Fettsäuren im Liquor oder in verschiedenen isolierten Fraktionen zu erfassen. Erst die Einführung dieser chromatographischen Techniken in die Lipidchemie des Liquors brachte den entscheidenden Fortschritt.

B) Hauptteil

I. Zielsetzung der Arbeit

Jede Lipiduntersuchung läßt im Liquor wie auch in anderen Medien stets mehr oder weniger deutlich drei Arbeitsgänge erkennen, wie sehr auch immer die in diesen drei Phasen angewandten Methoden variieren mögen. Der Extraktion der Lipide folgt als zweiter Schritt die Separation und Identifizierung und schließlich in der dritten Phase die quantitative oder nur qualitative Bestimmung der isolierten Komponenten. Wegen der Vielzahl der Methoden zur Extraktion, Fraktionierung und quantitativen Bestimmung differieren die Ergebnisse der verschiedenen Autoren und sind nur schwer miteinander vergleichbar. Darüberhinaus nehmen noch andere Faktoren auf Ausbeute und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht unerheblich Einfluß. Die Lipidchemie des Liquors wird durch den sehr geringen Gehalt an Gesamtlipid (2 mg%), den meist nur in beschränkter Menge zur Verfügung stehenden Liquor und

die daher notwendigen mikroanalytischen Techniken außerordentlich kompliziert. Die Art des Patientenmaterials - meist wird zur Gewinnung von Normalwerten Liquor psychiatrisch Erkrankter untersucht - dürfte nicht ohne Bedeutung sein. Außerdem spielt für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Entnahmeort eine Rolle. So haben TOURTELLOTTE (42), PHILLIPS und ROBINSON (25) sowie CURTIS und SEIPEL (9) auf das Phänomen aufmerksam gemacht, daß die quantitative Ausbeute z.B. an Gesamtphospholipid zur Liquormenge, die zur Analyse kommt, ein etwa reziprokes Verhalten zeigt, was auf Unterschiede in der Lipidzusammensetzung von Liquoranteilen aus verschiedenen Hirnbezirken hinweist, etwa entsprechend dem unterschiedlichen Eiweißgehalt von cerebralem und lumbalem Liquor. Möglicherweise bestehen insofern auch Unterschiede zwischen Ventrikelliquor und jenem Liquor, der mit der Hirnoberfläche in länger dauernde Berührung gekommen ist. Diese Differenzen dürften auf örtlich voneinander abweichenden Exkretions- und Resorptionsverhältnissen beruhen.

Die meisten Autoren konservieren Liquorproben, falls diese nicht sofort verarbeitet werden können, durch Einfrieren bei -15 bis -20°C und betonen, daß dieser Prozeß das Lipidspektrum weder qualitativ noch quantitativ verändere. McARDLE und ZILKHA (22) untersuchten solcherart aufbewahrten Liquor (-15°C) in Intervallen bis zu 5 Monaten und konnten keine Ver-

änderungen feststellen, erwähnen aber, daß beim Auftauen der eingefrorenen Liquorproben Phospholipide möglicherweise nicht mehr vollständig in Lösung gehen; dies könne aber durch vorsichtiges Erwärmen und sorgfältiges Mischen vermieden werden. TOURTELLOTTE (42) und CURTIS und SEIPEL (9) dagegen betonen, daß beim Auftauen doch - etwa durch Einschluß in das unlösliche Sediment - nicht zu vernachlässigende Liquormengen verlorengehen, falls nur die leicht zu pipettierende flüssige Phase analysiert wird. TOURTELLOTTE (42) bevorzugt daher zur Konservierung eine Temperatur von + 4°C und konnte unter diesen Bedingungen innerhalb von 6 Tagen keine signifikanten Veränderungen der Phospholipide feststellen. Die Ergebnisse von POSER und CURRAN (29), die kein freies Cholesterin in Normalliquoren nachweisen konnten, interpretierte er (42) zum Teil als Auftauverluste der bei -20°C eingefrorenen Liquorproben. Wegen der Abnahme des Gehaltes an freiem Cholesterin durch längeres Stehen bei Raumtemperatur empfehlen z.B. ZÖLLNER und KIRSCH (53) eine rasche Verarbeitung von Serum.

Das sind einige der Faktoren, welche die differierenden Ergebnisse erklären könnten. Zur Illustration werden in Tabelle III und IV die Liquornormalwerte verschiedener Untersucher für Gesamtlipid, Gesamtcholesterin bzw. freies Cholesterin und in Tabelle V die für den organisch gebundenen Phosphor-

anteil sowie die Phosphatidnormalverteilung (Prozent des Phosphatidgesamtphosphors) vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle III.

Liquornormalwerte für Gesamtlipid (mg%)

LIER (19) (1940)	0,5 - 1
JANBON (16) (1949)	50 - 100
ROBOZ (30) (1958)	2,5
TOURTELLOTTE (44) (1959)	1,25
CURTIS (9) (1961)	1 - 2
FARSTAD (13) (1965)	2,83
PILZ u. FRICK (27) (1966)	4,1

Aus den genannten Gründen sind diese Werte nur sehr schwer vergleichbar. Darüber hinaus ermittelte z.B. FARSTAD (13) seine Werte einzelner säulenchromatographisch gewonnener Fraktionen über den Fettsäuregehalt. ROBOZ et al. (30) machen keine Angaben über die Art des untersuchten Materials. Das Lecithin TOURTELLOTTES (44) ist ein indirekter, berechneter Differenzwert. Die einzelnen Phosphatidfraktionen in Tabelle V sind sicherlich von sehr unterschied-

lichem Reinheitsgrad, abhängig von der angewandten Separationsmethode.

Tabelle IV.

Liquornormalwerte für Gesamtcholesterin und freies Cholesterin (mg%)

	Gesamt-cholesterin	freies Cholesterin
PIGHINI (26) (1909)	./.	./.
PLAUT (28) (1933)	0,200	./.
SELBACH (35) (1944)	0,240	./.
ROBOZ (30) (1958)	0,400	0,315
POSER (29) (1958)	0,110	./.
TOURTELLOTTE (44) (1959)	0,415	0,109
TICHY (39) (1964)	0,530	0,360
FARSTAD (13) (1965)	0,860	0,350
PILZ u. FRICK (27) (1966)	0,459	0,139

Eine detailliertere Analyse dieser Werte würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Jedenfalls schwanken die Gesamtlipidnormalwerte zwischen 1 mg% und 100 mg%, der niedrigste Wert für Gesamtcholesterin beträgt 0 bzw. 0,110 mg%, der höchste 0,860 mg%.

Während z.B. POSER und CURRAN (29) noch 1958 freies Cholesterin nicht nachweisen konnten, berechnete FARSTAD (13) auf Grund des indirekt ermittelten Estercholesterinwertes von 0,51 mg% für diese Fraktion einen Normalwert von 0,350 mg%.

Tabelle V.

Liquornormalwerte für Gesamtphosphatidphosphor (y%) und Normalverteilung der Phospholipide (% des Gesamtphosphatidphosphors)

	y% Phosphatidphosphor	Lysolecithin	Lecithin	Kephalin	Sphingomyelin
ROEDER (31) (1940)	25,0	./.	./.	./.	./.
TOURTELLOTTE (44) (1959)	16,1	./.	47,8	27,4	24,8
PAPADOPOULOS (24) (1960)	20,0	7,0	60,0	17,0	16,0
McARDLE (22) (1962)	15,0	11,2	56,7	5,2	26,9
PHILLIPS (25) (1963)	17,0	6,8	69,3	6,1	20,1
PILZ u. FRICK (27) (1966)	16,29	9,9	63,9	./.	26,1

Die niedrigsten bzw. höchsten Werte für Lysolecithin betragen 0 bzw. 11,2 %, für Lecithin 47,8 % bzw. 69,3 %, für Kephalin 0 % bzw. 27,4 % und für Sphingomyelin 16,0 % bzw. 26,9 % des entsprechenden Gesamtphosphatidphosphorgehaltes.

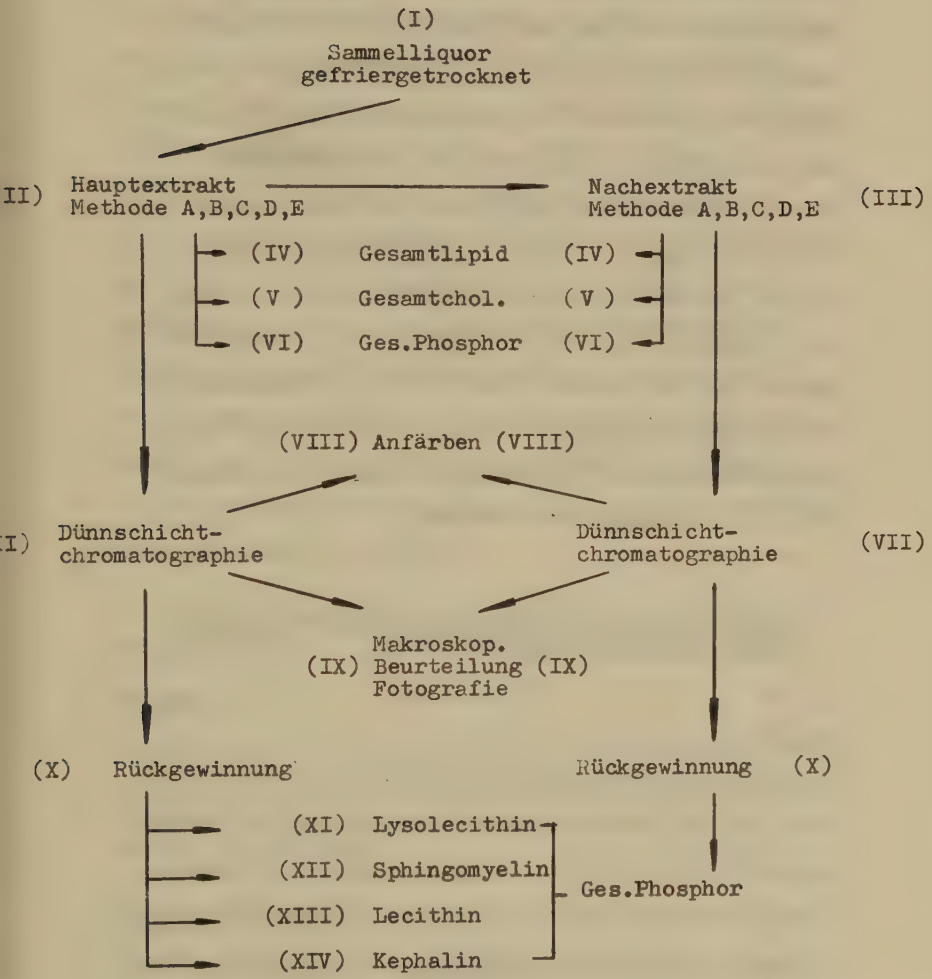
Die Lipidchemie des Liquor cerebrospinalis ist - wie die zitierten Normalwerte eindrucksvoll demonstrieren - auch heute noch durch erheblich differierende Ergebnisse belastet. CURTIS und SEIPEL (9) haben der Wahl der Extraktionsmethode dabei eine besondere Bedeutung zugesprochen, denn sie schreiben: "no analytical procedure for the quantitative estimation of these substances can be any better than the preliminary extraction upon which it is dependent." In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluß verschiedener Extraktionsmethoden auf die qualitative und quantitative Lipidausbeute im Liquor cerebrospinalis untersucht werden. x) Unter besonderer Berücksichtigung einer von SCHRAPPE und STÖCKERT (33) bevorzugten Methode soll weiterhin ein Vergleich der untersuchten Prozeduren nach mehr praktischen Gesichtspunkten - wie etwa Einfachheit in der Durchführung oder zeitlichem und apparativem Aufwand - gegeben werden.

---

x) Auf die Nachuntersuchung der von PILZ und FRICK (27) angegebenen Methode wurde verzichtet, da sie offensichtlich zu falschen Ergebnissen führt. Den Autoren gelang es beispielsweise nicht, Kephalin im Liquor nachzuweisen. Es steht zu vermuten, daß dieses wichtige Phospholipid durch die heiße Extraktion gefriergetrockneten Liquors zerstört wird.

II. Eigene Untersuchungen

1) Untersuchungsprogramm



Liquor wird gesammelt und gefriergetrocknet (I). Proben werden nach fünf verschiedenen Methoden extrahiert (II) und die wässrige Phase bzw. das Sediment nachextrahiert (III). In den Haupt- und Nachextrakten werden das Gesamtlipid (IV), das Gesamtcholesterin (V) sowie der Gesamtphosphor (VI) quantitativ bestimmt. Aliquote Mengen der Haupt- und Nachextrakte werden dünnschichtchromatographiert (VII) und die Fraktionen auf den Platten sichtbar gemacht (VIII). Die Mengenverhältnisse werden grob makroskopisch beurteilt und die Platten fotografiert (IX). Die Phospholipidfraktionen werden von den Platten quantitativ zurückgewonnen (X) und der Phosphorgehalt des Lysolecithins (XI), Sphingomyelins (XII), Lecithins (XIII) und Kephalins (XIV) quantitativ bestimmt.

2) Erläuterungen zum Untersuchungsschema und Beschreibung der Methoden

Ad I)

Um die erwähnten Störfaktoren wie Art des Materials oder Art und Zeitdauer der Konservierung weitgehend auszuschalten, wurde mit einem gefriergetrockneten Sammelliquor gearbeitet. Dazu wurde der im Labor anfallende Encephalographieliquor nach Zentrifugieren (15 Min.) ohne Berücksichtigung irgendwelcher klinischer Daten in Portionen bis zu 50 ml in einem Sammel-

gefäß jeweils sofort gefriergetrocknet. Insgesamt wurden nahezu 500 ml Liquor erreicht; die Trockenmasse wurde mit 1,20 g pro 100 ml Liquor ermittelt. Diese wurde quantitativ durch ein Kupferdrahtsieb von 0,09 mm Porengröße gegeben und außer zur Entnahme der Analysenmengen in einer gut verschließbaren Plastikflasche in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt. TOURTELLOTTE (41) (43), ROBOZ et al. (30) und CURTIS und SEIPEL (9) haben ebenfalls mit gefriergetrocknetem Liquor gearbeitet und Veränderungen des Lipidspektrums durch diese Prozedur nicht feststellen können. Zur Analyse wurden adaequate Mengen gefriergetrockneter Substanz eingewogen, in entsprechenden Mengen Wasser sorgfältig gelöst und nach einer von SCHRAPPE und STÖCKERT (33) bevorzugten sowie vier weiteren in der Literatur beschriebenen Methoden extrahiert.

Ad II)/III)

Methode A

Diese Methode bevorzugen SCHRAPPE und STÖCKERT (33), in ähnlicher Form wird sie von CHRISTENSEN LOU und MATZKE (7) angewandt.

Hauptextraktion

Nach Überführung der Liquorprobe [x]) in einen Scheide-

---

[x]) Es wurde bei allen Extraktionen 20 ml eingesetzt.

trichter (500 ml) wird die dreifache Menge Chloroform : Methanol (2:1) zugesetzt und in einer Schüttelvorrichtung eine intensive Durchmischung der wässrigen und organischen Phase besorgt (120 Min.). [x]) Nachdem sich durch ruhiges Stehen bei Raumtemperatur die obere wässrige von der unteren organischen Phase deutlich abgegrenzt hat (30 Min.), wird die Lipidphase über ein fettfreies Filter in einen Rundkolben (50 ml) abgelassen und die wässrige Phase nach dem beschriebenen Programm mit der doppelten Menge Chloroform : Methanol (2:1) nachextrahiert (120 Min.). Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers werden die vereinigten Extrakte in einem Wasserbad von 40°C auf etwa 5 ml eingeengt, der Rückstand mit einer Saugpipette unter Spülen des Rundkolbens mit geringen Mengen Chloroform : Methanol (2:1) in ein Meßkölbchen (25 ml) überführt und aus diesem der Sauerstoff mit Stickstoff vertrieben. Bis zur Analyse verbleibt der Extrakt unter Stickstoff dicht verschlossen im Kühlschrank, erst dann wird nach Temperaturausgleich bis zur Marke mit Chloroform : Methanol (2:1) aufgefüllt.

Nachextraktion

Zur Gewinnung des Nachextraktes bei Methode A wird die bereits zweimal extrahierte obere wässrige Phase ein drittes und viertes Mal mit der dreifachen Menge

---

[x]) Schüttelfrequenz 250 - 300 pro Minute

Chloroform bzw. der dreifachen Menge Chloroform : Methanol (2:1) nachextrahiert (je 30 Min.). Die vereinigten Nachextrakte werden wie bei der Hauptextraktion eingeengt, quantitativ in ein Meßkölbchen (25 ml) überführt und bis zur Analyse aufbewahrt.

Methode B

Diese Methode bevorzugen McARDLE und ZILKHA (22). Sie beruht auf einer Lipoproteinfällung mit Trichloressigsäure und anschließender Extraktion des Praecipitats nach einer modifizierten, von FOLCH et al. (15) beschriebenen Extraktionsmethode.

Hauptextraktion

Die Lipoproteine der Liquorprobe werden in einem Zentrifugenglas durch Zusatz einer 50 %igen Trichloressigsäure - die Trichloressigsäureendkonzentration soll 10 % betragen - und sorgfältiges Mischen in einer Schüttelvorrichtung gefällt (30 Min.). Nach ruhigem Stehen bei Raumtemperatur (30 Min.) wird zentrifugiert (15 Min.) und der klare Überstand aspiriert und verworfen. Die Extraktion des Praecipitats erfolgt mit Chloroform : Methanol (2:1) (7,5 ml) unter Schütteln (30 Min.) und ruhigem Stehen mit gelegentlicher Durchmischung (120 Min.) bei Raumtemperatur. Dabei löst sich der größte Teil der Proteinpartikel; zur vollständigen Lösung wird Wasser (1,5 ml) unter sorgfältigem Mischen (5 Min.) zugesetzt.

Nach Zentrifugation (10 Min.) grenzen sich zwei Phasen ab mit einer dünnen Proteinzwischenschicht. Die untere lipidhaltige Phase wird mit einer Saugpipette in einen Rundkolben (50 ml) überführt und die obere mit Chloroform : Methanol (2:1) (5 ml) durch Schütteln (5 Min.) und ruhiges Stehen (30 Min.) nachextrahiert. Nach Wasserzusatz (1 ml) und sorgfältigem Lösen der Eiweißpartikel durch Schütteln (5 Min.) wird zentrifugiert (10 Min.) und die untere Phase gewonnen. Im Rundkolben (50 ml) werden die vereinigten Extrakte mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad von 40°C eingeengt, unter Spülen mit geringen Mengen Chloroform : Methanol (2:1) in ein Meßkölbchen (25 ml) überführt und bis zur Analyse unter Stickstoff dicht verschlossen in einem Kühlschrank aufbewahrt. Erst dann wird nach Temperaturausgleich bis zur Marke mit Chloroform : Methanol (2:1) aufgefüllt.

Nachextraktion

Zur Gewinnung des Nachextraktes bei Methode B wird die obere wässrige Phase mit geringen Chloroform : Methanol (2:1)-Spülmengen aus dem Zentrifugenglas in einen Scheidetrichter (500 ml) überführt. Das weitere Programm entspricht dem bei Methode A - Nachextraktion beschriebenen.

Methode C

Nach dieser Methode haben PHILLIPS und ROBINSON (25) extrahiert. Es handelt sich um eine Modifikation der von FOLCH et al. (15) für Gewebe beschriebenen Extraktionsmethode.

Hauptextraktion

Die mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad von 37°C auf etwa 1 ml eingeengte Liquorprobe wird mit Chloroform : Methanol (2:1) (29 ml) gefällt, in der Schüttelvorrichtung durchmischt (60 Min.) und unter Spülen mit geringen Mengen Chloroform : Methanol (2:1) über ein entfettetes Filter in einen zweiten Rundkolben gegeben. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wird in einem Wasserbad von 37°C erneut eingeengt, der trockene Rückstand durch Schütteln (10 Min.) mit Chloroform : Methanol (2:1) (20 ml) mit 4 % Wassergehalt extrahiert, der Extrakt über ein Filter in einen weiteren Rundkolben gegeben und wiederum eingeengt. Nach Wiederholung dieses Schrittes wird der trockene Rückstand zweimal mit Chloroform : Methanol (2:1) (10 ml) durch Schütteln (10 Min.) extrahiert, der Extrakt in einen weiteren Rundkolben filtriert, eingeengt und schließlich in Chloroform : Methanol (2:1) (16 ml) gelöst. Nach Überführung in einen Scheidetrichter (500 ml) wird mit einer 0,1 m KCl-Lösung (4 ml) in einer Schüttelvorrichtung sorg-

fältig gemischt (15 Min.) und nach Abgrenzung der wässrigen von der organischen Phase die wässrige Phase, welche das wasserlösliche Material enthält, abgesaugt und für die Nachextraktion gesammelt. Der unlösliche Film der Zwischenschicht wird nochmals mit kleinen Mengen (1 : 5) KCl : Chloroform:Methanol(2:1) ausgewaschen, die untere lipidhaltige Phase durch Öffnen des Scheidetrichterhahnes in einem Rundkolben (50 ml) gewonnen und diese mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad von 37°C auf etwa 5 ml eingeengt und schließlich unter Spülen mit geringen Mengen Chloroform : Methanol (2:1) in ein Meßkölbchen (25 ml) überführt. Bis zur Analyse verbleibt der Extrakt unter Stickstoff dicht verschlossen im Kühlschrank, erst dann wird nach Temperaturausgleich bis zur Marke mit Chloroform : Methanol (2:1) aufgefüllt.

Nachextraktion

Zur Gewinnung des Nachextraktes bei Methode C werden die Rundkolben mit geringen Mengen Chloroform : Methanol (2:1) mit 4 % Wassergehalt gespült und mit der zurückgewonnenen 0,1 m KCl-Lösung des Hauptextraktes dem Scheidetrichter zugefügt, mit dem die Hauptextraktion ausgeführt worden war. Das weitere Programm entspricht dem bei Methode A - Nachextraktion beschriebenen.

Methode D

Nach dieser Methode haben ROBOZ et al. (30) extrahiert. Sie beruht auf Extraktion mit heißem Chloroform : Methanol (2:1) und anschließender Reinigung des Extraktes mit wässrigen Medien.

Hauptextraktion

Die Liquorprobe wird in einem Zentrifugenglas mit Chloroform : Methanol (2:1) (20 ml) kurz gemischt, das verschlossene Zentrifugenglas in einem Wasserbad auf 85 - 90°C erwärmt (3 Min.) und der Inhalt unter wiederholtem Eintauchen in das Wasserbad sorgfältig geschüttelt (2 Min.). Die obere Phase, welche das wasserlösliche Material enthält, wird nach Zentrifugation (20 Min.) mit einer Saugpipette gewonnen und zur Nachextraktion gesammelt, zur unteren Phase wird unter Schütteln Methanol (2 ml) zugefügt und der Inhalt mit geringen Chloroform : Methanol (2:1)-Spülmengen in ein weiteres Zentrifugenglas filtriert. Zur Entfernung wasserlöslicher Substanzen wird der Extrakt mit Wasser (4 ml) versetzt (1 Min.) und nach Zentrifugation (20 Min.) die obere wässrige Phase mit einer Saugpipette zurückgewonnen und für die Nachextraktion gesammelt. Um Reste des zugesetzten Wassers vollständig zu entfernen, werden die Wände des Zentrifugenglases zweimal mit einer Chloroform: Methanol(2:1) - gesättigten $CaCl_2$-Lösung (je 3 ml)

gewaschen, diese mit einer Saugpipette zurückgewonnen und ebenfalls für die Nachextraktion gesammelt. Nach Überführung der unteren Phase in einen Rundkolben (50 ml) wird diese mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad von 45°C eingeengt, der trockene Rückstand in Chloroform : Methanol (2:1) aufgenommen und in ein Meßkölbchen (25 ml) filtriert. Bis zur Analyse verbleibt der Extrakt unter Stickstoff dicht verschlossen im Kühlschrank, erst dann wird nach Temperaturausgleich bis zur Marke mit Chloroform : Methanol (2:1) aufgefüllt.

Nachextraktion

Die gesammelten Waschmengen des Hauptextraktes werden über das zweite Zentrifugenglas in einen Scheidetrichter (500 ml) gegeben. Das weitere Programm entspricht dem bei Methode A - Nachextraktion beschriebenen.

Methode E

Diese Methode haben MARINETTI et al. (21) zur Plasmalipidextraktion beschrieben. Sie beruht auf Extraktion mit verschiedenen heißen Lösungsmittelsystemen, auf Liquor hat sie bisher noch keine Anwendung gefunden.

Hauptextraktion

Die mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad von 37°C auf etwa 3 ml eingeengte Liquorprobe wird in einem Zentrifugenglas mit Methanol (60°C) und Chloroform (12 ml : 4 ml) vermischt und in einem Wasserbad auf 60°C erwärmt (2 Min.). Nach Zentrifugation (15 Min.) wird der Überstand mit einer Saugpipette in einen Rundkolben (50 ml) überführt und das Sediment in der gleichen Weise noch zweimal mit Chloroform : Methanol (1:1) (je 10 ml) extrahiert. Der Inhalt des Rundkolbens wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad von 37°C eingeengt, der trockene Rückstand viermal mit Chloroform (je 2 ml) bei 40°C extrahiert und die Extrakte in einem Meßkölbchen (25 ml) gesammelt. Bis zur Analyse verbleibt der Extrakt unter Stickstoff dicht verschlossen im Kühlschrank, erst dann wird nach Temperaturausgleich bis zur Marke mit Chloroform : Methanol (2:1) aufgefüllt.

Nachextraktion

Um ein Arbeiten in einem Zweiphasensystem zu ermöglichen, werden die Rückstände im Zentrifugenglas und Rundkolben in Wasser (20 ml) aufgenommen und in einen Scheidetrichter (500 ml) überführt. Die üblichen Lösungsmittel zur Nachextraktion werden vor Zugabe zum Scheidetrichter ebenfalls erst über Zentrifugenglas

und Rundkolben gegeben. Sonst entspricht das Programm dem bei Methode A - Nachextraktion beschriebenen.

Ad IV)

Gesamtlipidbestimmung

Die Gesamtlipidbestimmung in den Haupt- und Nachextrakten erfolgte nach der von ZÖLLNER und KIRSCH (54) für die Gesamtlipidbestimmung im Serum ausgearbeiteten Methode, deren Anwendung auf Liquorlipidextrakte SCHRAPPE und STÖCKERT (33) überprüften. Sie beruht auf der von CHABROL und CHARONNAT (5) angegebenen und von CHABROL und BÖSZÖRMENYI (6) näher untersuchten Sulfophosphovanillinreaktion, einer Reaktion der Abbauprodukte ungesättigter Lipoide mit Vanillin in Phosphorsäure.

1 ml des Haupt- bzw. Nachextraktes werden in ein gut verschließbares Zentrifugenglas gegeben. In einem Wasserbad von 45°C wird das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom restlos vertrieben, der Wandrückstand unter Drehen und Kippen sorgfältig in 0,2 ml konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und das fest verschlossene Glas 10 Minuten in einem Wasserbad von Siedetemperatur erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird 3 ml Sulfophosphovanillinreagens zugesetzt und mit einem Glasstab sorgfältig gemischt. Es bildet sich ein rosa Farbton, der nach 40 Minuten in 1 cm

Küvetten bei 546 mμ in einem Photometer Eppendorf photometriert wird. Es werden jeweils Zwei- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. Durch Analyse steigender Mengen (10, 15, 20, 25 und 30 y) einer Cholesterinstandardlösung wird für jede Bestimmung eine individuelle Eichkurve gewonnen und die Extinktion für 10 y Cholesterin ermittelt. Ein Leerwerttriplikat wird ebenfalls durch jeden Ansatz neu mitgeführt und die Leerwertmittelwertextinktion von der Analysen- und Cholesterinstandardmittelwertextinktion abgezogen. Die Berechnung erfolgt nach der Formel: (20 ml Ausgangsmenge)

$$\frac{(E_{MA} - E_{ML}) \times 25 \times 10 \times 5}{E_{MChol} - E_{ML}} = y\% \text{ Lipid im Liquor}$$

E_{MA} = Analysenmittelwertextinktion (aus 2 bzw. 3 Werten)

E_{ML} = Leerwertmittelwertextinktion (aus 3 Werten)

E_{MChol} = Cholesterinstandardmittelwertextinktion für 10 y Cholesterin (aus 5 Werten)

Das Ergebnis drückt also jene Menge Lipid aus, die im Liquor vorhanden wäre, wenn dort ausschließlich Cholesterin vorkäme. Da diese Voraussetzung nicht gegeben ist und verschiedene Lipide unterschiedliche spezifische Extinktionen mit der Sulfophosphovanillinreaktion besitzen, ist der hiermit bestimmte Gesamtlipid-

gehalt lediglich ein Annäherungswert. Die Methode hat sich aber in der Praxis zur orientierenden Bestimmung der Liquorlipide - nicht zuletzt wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit - bewährt.

Ad V)

Gesamtcholesterinbestimmung

Das Gesamtcholesterin wurde mit dem Eisenchloridreagens nach ZLATKIS et al. (52) und ZAK et al. (50) bestimmt, eine Methode, die auch ROBOZ et al. (30) zur Liquorcholesterinbestimmung anwandten.

In einem Reagensglas werden 4 ml des Haupt- bzw. Nachextraktes in 2 ml Portionen unter einem Stickstoffstrom in einem Wasserbad von 45°C eingeengt. Der trockene Rückstand wird in 1,5 ml Eisessig sorgfältig aufgenommen und unter Mischen mit einem Glasstab 1 ml Farbreagens zugegeben. Dabei bilden sich feine, sehr stabile Bläschen, die in einem Exsiccator vertrieben werden. Nach Überführen des Inhalts in 1 cm Küvetten wird der lila Farbstoff bei 546 mμ in einem Photometer Eppendorf photometriert. Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch Analyse eingewogener Mengen einer Cholesterinstandardlösung (2 x 20 y, 2 x 50 y) wird für jede Bestimmung eine eigene Eichkurve gewonnen und die Extinktion für 10 y Cholesterin ermittelt. Ein Leer-

wertduplikat wird ebenfalls durch jeden Ansatz neu mitgeführt und die Leerwertmittelwertextinktion von der Analysen- und Cholesterinstandardmittelwertextinktion abgezogen.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel: (20 ml Ausgangsmenge)

$$\frac{(E_{MA} - E_{ML}) \times 25 \times 10 \times 5}{(E_{MChol} - E_{ML}) \times 4} = y\% \text{ Gesamtcholesterin}$$

E_{MA} = Analysenmittelwertextinktion (aus 2 Werten)

E_{ML} = Leerwertmittelwertextinktion (aus 2 Werten)

E_{MChol} = Cholesterinstandardmittelwertextinktion für 10 y Cholesterin (aus 4 Werten)

Ad VI)

Die Gesamtphosphorbestimmung in den Haupt- und Nachextrakten wird gemeinsam mit der Bestimmung des Phosphorgehaltes der von den Dünnschichtchromatographieplatten zurückgewonnenen Phosphatidfraktionen beschrieben.

Ad VII)

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (STAHL (37), MANGOLD (20)), die WEICKER (49) in Deutschland in die klinische Chemie der Serumlipoide

einführte, wurde eine im Handel käufliche Grundausrüstung benutzt.

Kieselgel HR wird auf Glasplatten (20 x 20 cm) in einer Schichtdicke von 0,2 mm aufgetragen und nach staubgeschützter Lufttrocknung durch Leerchromatographie mit dem unten beschriebenen Fließmittel eine zusätzliche Reinigung erreicht. Bis zur Analyse verbleiben die Platten in einem Exsiccator (Shandon); vor der Chromatographie werden sie bei 110°C im Trockenschrank (30 Min.) aktiviert. 10 ml des Haupt- bzw. Nachextraktes werden auf einer Platte nebeneinander chromatographiert. Diese werden in Einzelportionen in einem Spitzglas unter einem Stickstoffstrom in einem Wasserbad von 45°C eingeengt und der Rückstand mit einer Mikrospritze in nebeneinander gesetzten Tropfen 3 cm vom Rand der Platte entfernt strichförmig aufgetragen, ohne dabei die Kieselgelschicht zu beschädigen. Durch dreimaliges Spülen der Wand des Spitzglases mit geringen Mengen Chloroform : Methanol (2:1) und Auftragen der Spülmengen wird ein quantitatives Arbeiten garantiert. In einer vorbereiteten gesättigten Kammer wird die Platte in Chloroform : Methanol : Wasser : Ammoniak (65 ml : 25 ml : 3 ml : 1 ml) als Fließmittel aufsteigend entwickelt. Nach etwa 45 Minuten, wenn die Fließmittelfront eine vorgezeichnete Marke erreicht hat (Gesamtsteighöhe 15 cm), wird die Platte aus der

Kammer genommen und zur Lufttrockung staubgeschützt aufbewahrt.

Ad VIII)

Darstellung der Lipidfraktionen auf der Dünnschichtchromatographieplatte

Das dünnschichtchromatographische Verteilungsmuster der Liquorlipidbanden, welches mit dem oben beschriebenen Fließmittel erzielt wird, wurde durch Anwendung spezifischer Anfärbereagentien, synchrone Chromatographie reiner Lipidfraktionen und Vergleich der Rf-Werte von SCHRAPPE und STÖCKERT (33) untersucht. Diese Ergebnisse ermöglichten die Identifizierung der einzelnen Fraktionen in der vorliegenden Arbeit, es genügte daher eine allgemeine Sichtbarmachung der einzelnen Banden mit einem unspezifischen, universellen Reagens.

Nach Vertreibung des Lösungsmittelgemisches wird die Platte mit einer 50 %igen Schwefelsäure gleichmäßig besprüht. Dabei grenzen sich die Cholesterinbanden am Plattenende bereits als eben wahrnehmbare Anfärbung ab. Ein Erhitzen auf 160°C im Trockenschrank (10 Min.) vervollständigt die Ankohlung des gesamten organischen Materials auf der Platte. Dabei stellen sich die Fraktionen über verschiedene Zwischenfarben schließlich als geschwärzte Banden dar.

Ad IX)

Makroskopische Beurteilung und Fotografie

Die auf der Platte nebeneinander liegenden Banden der Haupt- und Nachextrakte werden makroskopisch verglichen. Dazu wird der Schwärzungsgrad und die Größe der Banden, die Trennschärfe und Zahl der Fraktionen sowie die Menge des im Startpunkt zurückgebliebenen Materials beurteilt. Zur Dokumentation werden die Platten fotografiert.

Ad VI)

Phosphorbestimmung in den Haupt- und Nachextrakten sowie in den dünnschichtchromatographisch gewonnenen Phosphatidfraktionen

Die Phosphorbestimmungen erfolgten nach der von FISKE und SUBBAROW (14) ausgearbeiteten Methode in der von BARTLETT (2) angegebenen Modifikation. Sie beruht auf der Bildung von Phosphomolybdänsäure aus Orthophosphat und Ammoniummolybdat und anschließender Reduktion der Phosphomolybdänsäure zu Molybdänblau unter Verwendung von 1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfosäure als reduzierendes Agens. Nach dieser Methode haben auch McARDLE und ZILKHA (22), ZILKHA und McARDLE (51), PHILLIPS und ROBINSON (25) und PAPADOPOULOS et al. (24) den Phospholipidphosphor und ODESSKY et al. (23) den anorganischen Phosphor im Liquor bestimmt.

1 ml des Haupt- bzw. 2 ml des Nachextraktes werden in

phosphorfreien Zentrifugengläsern unter einem Stickstoffstrom in einem Wasserbad von 45°C bis zum trockenen Rückstand eingeengt. Die eigentliche Analyse erfolgt nach dem unter Punkt XI, XII, XIII, XIV beschriebenen Programm. Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Ad X)

Rückgewinnung der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen

Die durch Besprühen mit 50 %iger Schwefelsäure und Erhitzen auf 160°C markierten Phosphatidfraktionen - Lysolecithin, Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin - der Hauptextrakte werden aus der Kieselgelschicht ausgeschnitten und mit Hilfe eines kleinen Spatels und Pinsels in phosphorfreie Zentrifugengläser überführt. Von den Dünnschichtchromatogrammen der Nachextrakte werden jeweils drei korrespondierende Flächen "oben", "Mitte" und "unten" abgetragen. Aus dem Leer- und Vollgewicht der Gläser wird die jeweilige Kieselgelmenge berechnet. Von der gleichen Platte werden außerdem nach Fläche und Höhe korrespondierende Felder als Kieselgelleerwerte (3) gewonnen, deren Gewicht ebenfalls ausgewogen wird. Die eigentliche Analyse erfolgt nach dem unter Punkt XI, XII, XIII und XIV beschriebenen Programm.

Ad XI), XII), XIII), XIV)

Programm der Phosphorbestimmung

Der Inhalt der Gläser (Punkt VI und X) wird durch Zusatz von je 1 ml Veraschungsgemisch und Erhitzen auf 140°C im Trockenschrank über Nacht verascht. Am nächsten Morgen soll der Inhalt der fest verschlossenen Gläser völlig klar sein, anderenfalls wird noch für einige Stunden auf 170°C erhitzt. Nach Temperaturausgleich und Zugabe von 3,4 ml Ammoniummolybdatlösung, 0,2 ml Farbreagens und Erhitzen (10 Min.) in einem Wasserbad von Siedetemperatur entwickelt sich die eigentliche Farbreaktion, deren Intensität nach Temperaturausgleich und Abzentrifugieren des Kieselgels in einem Zeiss Spektrometer bei 760 nm gemessen wird. Durch Analyse steigender Mengen (2 y, 3 y, 4 y, 5 y Phosphor) einer Kaliumdihydrogenphosphat-Phosphorstandardlösung wird für jeden Ansatz eine eigene Eichkurve gewonnen und die Extinktion für 1 y Phosphor ermittelt. Ein Leerwerttriplikat wird ebenfalls durch jede Analyse neu mitgeführt und die Leerwertmittelwertextinktion von den Analysenextinktionen, der Phosphorstandardmittelwertextinktion und der Kieselgelleerwertmittelwertextinktion abgezogen. Von den Extinktionen der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen muß außerdem noch jeweils die reine Kieselgelleerwertmittelwertextinktion für die entsprechende Analysenkieselgelmenge abgezogen werden.

Die Berechnung des Gesamtphosphors in den Haupt- bzw. Nachextrakten erfolgt nach den Formeln:
(20 ml Ausgangsmenge)

$$\frac{(E_{MA} - E_{ML}) \times 25 \times 5}{(E_{MPh} - E_{ML})} = y\% \text{ Phosphor (Hauptextrakt)}$$

$$\frac{(E_{MA} - E_{ML}) \times 25 \times 5}{(E_{MPh} - E_{ML}) \times 2} = y\% \text{ Phosphor (Nachextrakt)}$$

E_{MA} = Analysenmittelwertextinktion (aus 2 Werten)

E_{ML} = Leerwertmittelwertextinktion (aus 3 Werten)

E_{MPh} = Phosphorstandardmittelwertextinktion für 1 y Phosphor (aus 4 Werten)

Die Berechnung des Phosphorgehalts der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen erfolgt nach der Formel:

$$\frac{(E_A - E_{ML} - (E_{MK} - E_{ML})) \times 25 \times 5}{(E_{MPh} - E_{ML}) \times 10} = y\% \text{ Phosphor}$$

E_A = Analysenextinktion (1 Wert)

E_{ML} = Leerwertmittelwertextinktion (aus 3 Werten)

E_{MK} = Kieselgelleerwertmittelwertextinktion (aus 3 Werten), für die betreffende Analysenkieselgelmenge berechnet

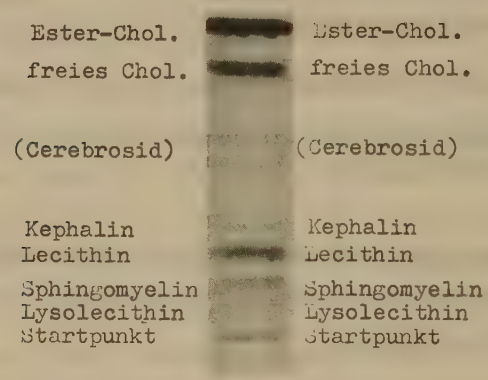
E_{MPh} = Phosphorstandardmittelwertextinktion für 1 y Phosphor (aus 4 Werten)

III. Ergebnisse

1) Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatogramme der nach den fünf beschriebenen Extraktionsmethoden gewonnenen Haupt- und Nachextrakte zeigen die Bilder 2 - 6. Diesen ist zur Erklärung der einzelnen Banden ein Serumdünnschichtchromatogramm (Bild 1) vorangestellt.

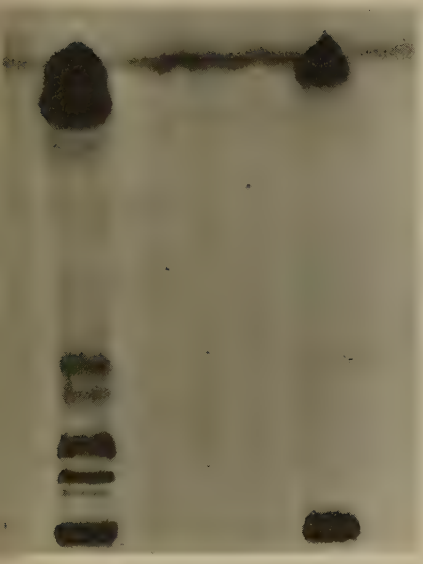
Bild 1



Haupt- und Nachextrakt sind jeweils nebeneinander abgebildet. Die chromatographischen Lipidspektren der Hauptextrakte stimmen weitgehend überein. Jeder der fünf verschiedenen Extrakte zeigt die Lipidfraktionen des Liquors. Neben dem Startpunkt kommen 7 Hauptbanden zur Darstellung. Der Auftragstelle folgt als schwache Bande Lysolecithin, an der Fließmittelfront bewegt sich die Cholesterinesterfraktion,

von welcher sich das freie Cholesterin mehr oder weniger deutlich abtrennt. Die mit diesen beiden Banden laufenden Triglyceride kommen wegen der Art des gewählten Fließmittels nicht zur Darstellung.

Bild 2



METHODE A

Hauptextrakt - Nachextrakt

Bild 3

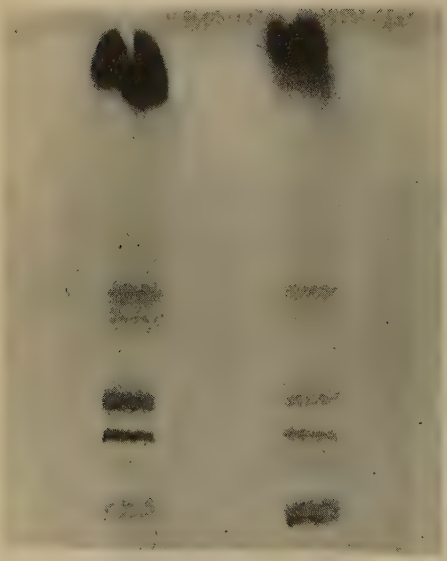
METHODE B

Hauptextrakt - Nachextrakt

Der Lysolecithinfraktion benachbart folgen die Sphingomyelin- und Lecithinbande. Zwischen der Cerebrosiddoppelbande und der Lecithinfraktion stellt sich das Kephalin dar. In allen Chromatogrammen ist neben dem

Cholesterinfleck an der Fließmittelfront Lecithin die stärkste Bande, an Fleckengröße und Schwärzungsintensität folgen die Sphingomyelin- und die Cerebrosidfraktion. Dem Normallipidverteilungsmust

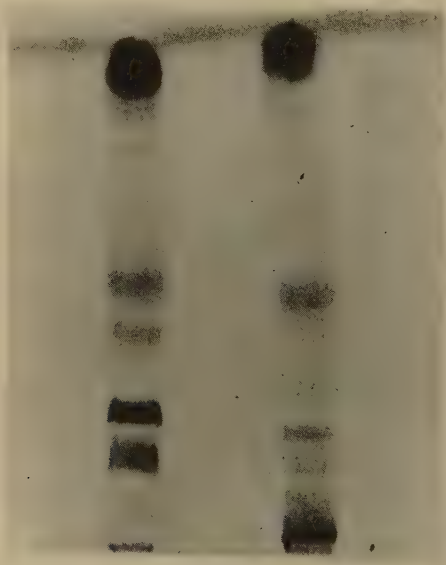
Bild 4



METHODE C

Hauptextrakt - Nachextrakt

Bild 5



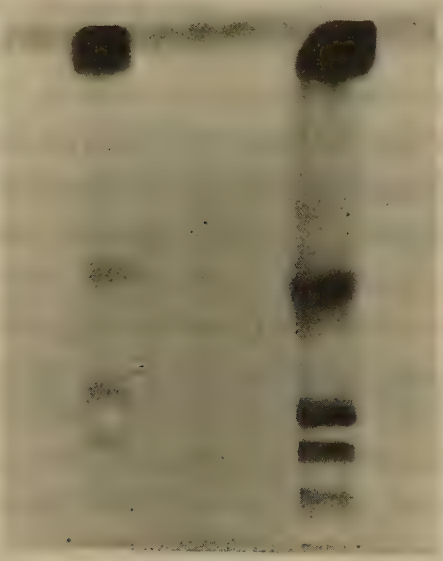
METHODE D

Hauptextrakt - Nachextrakt

des Liquors entsprechend stellen Lysolecithin und Kephalin die schwächsten Banden. Die Lysolecithinfraktion ist nicht rein - mit ihr laufen noch geringe Mengen Phosphatidylserin und Phosphatidyl-

inositol - sie ist bei Methode C und D am wenigsten ausgeprägt, zumindest sehr viel deutlicher bei Methode B und E. Methode B zeigt dünnschichtchromatographisch nur eine geringe Kephalinausbeute.

Bild 6



METHODE E

Nachextrakt - Hauptextrakt

Die Rückstände im Startpunkt sind von Methode zu Methode, gering auch von Versuch zu Versuch, verschieden, am geringsten sind sie bei Methode C und D.

Bild 1 zeigt zum Vergleich ein Serumdünnschichtchromatogramm. Dazu wurde Serum auf Liquorproportionen mit H_2O verdünnt und eine entsprechende Menge nach Methode A extrahiert. Es zeigt sich die große Ähnlichkeit mit dem Liquorlipidspektrum. Die gleichen Lipidfraktionen grenzen sich ab und bis auf Kephalin und Cerebrosid stimmt prima vista die relative Verteilung der einzelnen Fraktionen mit der des Liquors überein.

Die nach einem einheitlichen Extraktionsprogramm gewonnenen Nachextrakte der fünf Methoden wurden ebenfalls chromatographisch untersucht, um neben den chemischen Bestimmungen spezifischer Fraktionen die Frage zu klären, ob überhaupt und wenn ja in welcher Menge und Art Lipid in den Nachextrakten vorhanden ist. Wie die Bilder 2 bis 6 demonstrieren, lassen sich in jedem der Nachextrakte nicht unerhebliche Lipidmengen nachweisen. Die Lipidspektren der Nachextrakte zeigen wie die der Hauptextrakte weitgehende Übereinstimmung. Deutlichste Fraktion in allen Nachextrakten ist eine Bande an der Fließmittelfront, deren Rf-Wert mit dem des Cholesterins der Hauptextrakte übereinstimmt. In Höhe des Cerebrosids der Hauptextrakte stellt sich bei allen Nachextrakten eine Fraktion dar, die nach Schwärzungsgrad und Bandenfläche dem Cholesterin nachfolgt. Sphingosin- und Glycerinphosphatide sind nur mäßig getrennt in Nähe des Startpunkts bzw. in Spuren in den korrespondieren-

den Positionen der Hauptextrakte vorhanden. Entsprechend der Art der Nachextraktion sind die Rückstände in den Startpunkten ausgeprägter als bei den Hauptextrakten.

2) Gesamtlipidbestimmung

Nach jeder der fünf beschriebenen Extraktionsmethoden wurde fünfmal extrahiert und in entsprechenden Mengen der so gewonnenen Hauptextrakte das Gesamtlipid nach der Sulfophosphovanillinmethode bestimmt. Die in Tabelle VI wiedergegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte aus Zwei- bzw. Dreifachbestimmungen.

Tabelle VI.

Vergleich der Gesamtlipidausbeute in den Hauptextrakten der fünf Extraktionsmethoden (mg %)

Versuch	Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E
1	2,31	2,23	1,82	2,13	1,79
2	2,55	2,21	1,88	2,26	1,69
3	2,33	2,25	1,81	2,19	1,92
4	2,31	2,26	1,88	2,17	1,94
5	2,28	2,29	1,85	2,21	1,89
Mittelwert $\bar{x}$	2,35	2,25	1,84	2,19	1,84
Standardabweichung $s^{+)}$	0,11	0,03	0,03	0,04	0,10

+) $s^2 = (S(x^2) - \bar{x}\, S(x)) : N - 1$

Die Gesamtlipidmittelwerte bewegen sich mit 2,35 mg % für Methode A, 2,25 mg % für Methode B, 1,84 mg % für Methode C, 2,19 mg % für Methode D und 1,84 mg % für Methode E in einem Bereich von 2,35 mg % und 1,84 mg % und zeigen damit nicht allzu große Differenzen. Methode A bringt mit 2,35 mg % bei einer Schwankungsbreite der Einzelwerte aus fünf Versuchen zwischen 2,28 mg % und 2,55 mg % den höchsten Gesamtlipidbetrag, während Methode C und E mit 1,84 mg % bei einer Schwankungsbreite der Einzelwerte aus fünf Versuchen zwischen 1,81 mg % und 1,88 mg % bzw. 1,69 mg % und 1,94 mg % die niedrigste Ausbeute zeigen. Der höchste (Methode A) und der niedrigste (Methode C und E) Gesamtlipidbetrag differieren um 0,51 mg %.

Zum Vergleich wurde in fünf weiteren Versuchen Nativliquor untersucht. 10 ml Proben von allerdings 5 verschiedenen Liquorportionen (Patienten ohne Anhalt für irgendeine neurologische Erkrankung) wurden nach Methode A (3 Versuche) und Methode B (2 Versuche) extrahiert und das Gesamtlipid bestimmt. Die in Tabelle VII wiedergegebenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Die Gesamtlipidwerte liegen niedriger als die entsprechenden Werte in Tabelle VI, wenn auch in einer ähnlichen Größenordnung. Sie zeigen außerdem eine schlechtere Übereinstimmung. Unterschiede in der

Tabelle VII.

Gesamtlipidausbeute in Hauptextrakten von Nativliquor (mg %)

Versuch	Methode A	Methode B
1	1,96	1,59
2	1,88	1,46
3	1,73	
Mittelwert	1,85	1,52

Ausbeute zwischen Methode A und B, die beim Arbeiten mit einem gefriergetrockneten Sammelliquor nur gering sind, treten in Tabelle VII deutlich hervor. Diese Differenzen dürften in dem sicherlich sehr unterschiedlichen Ausgangsmaterial eine Erklärung finden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Zweckmäßigkeit des in dieser Arbeit gewählten Untersuchungsprogramms. Vergleichbare Ergebnisse sind nur unter weitgehend standardisierten Bedingungen zu erwarten, das Arbeiten mit einem gefriergetrockneten Sammelliquor ist für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragen offensichtlich eine der bedeutsamsten.

Wie die Bilder 2 - 6 zeigen, lassen sich in jedem der fünf Nachextrakte dünnschichtchromatographisch noch nicht unerhebliche Lipidmengen nachweisen. Mit Hilfe

der Sulfophosphovanillinreaktion wurde versucht, diese Lipidmengen in den Nachextrakten quantitativ zu erfassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle VIII wiedergegeben; sie entsprechen den Hauptextrakt-gesamtlipidwerten in Tabelle VI. Es handelt sich um Mittelwerte aus Zwei- bzw. Dreifachbestimmungen. Das Gesamtlipid in den Nachextrakten ist in der Einheit mg Lipid / Ausgangsmenge (20 ml) angegeben, es handelt sich also um den Absolutbetrag, welcher durch die Nachextraktion jeweils noch erfaßt wurde und mit dem Sulfophosphovanillinreagens als Lipid reagierte. x)

Tabelle VIII.

Vergleich der Gesamtlipidausbeute in den Nachextrakten der fünf Extraktionsmethoden (mg Lipid / Ausgangsmenge)

Versuch	Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E
1	0,102	0,205	0,173	0,214	0,152
2	0,072	0,229	0,162	0,228	0,146
3	0,075	0,156	0,179	0,224	0,134
4	0,116	0,162	0,189	0,216	0,128
5	0,110	0,160	0,172	0,218	0,130
Mittelwert $\bar{x}$	0,095	0,182	0,174	0,220	0,138
Standard-abweichung s +)	0,020	0,033	0,009	0,005	0,010

x) Aus Gründen, die in der Diskussion erörtert werden sollen, wurde auf eine Umrechnung dieser Werte in mg % verzichtet.

+) $s^2 = (S(x^2) - \bar{x}\, S(x)) : N - 1$

Bei Methode D läßt sich im Nachextrakt mit der S.P.V.-Reaktion im Durchschnitt noch 0,22 mg Lipid nachweisen, bei Methode A nur 0,095 mg. Offensichtlich sind durch die Hauptextraktion bei Methode E im Durchschnitt 0,138 mg, bei Methode C 0,174 mg und bei Methode B 0,182 mg Lipid nicht erfaßt worden. Methode A zeigt die höchste Hauptextraktausbeute (Tabelle VI) bei geringstem Lipidgehalt im Nachextrakt. Diese Beziehung läßt sich bei den anderen Methoden nicht nachweisen; Methode E bringt bei geringster Hauptextraktionsausbeute (Tabelle VI) mit 0,138 mg nach Methode A zugleich auch den geringsten Lipidgehalt im Nachextrakt. Die in den Nachextrakten noch mit der S.P.V.-Reaktion nachweisbaren Lipidmengen schwanken zwischen 0,1 und 0,2 mg, d.h. werden 20 ml Liquor extrahiert, bleiben 0,1 - 0,2 mg Lipid unerfaßt. Um welche beträchtlichen Mengen es sich dabei handelt, wird erst deutlich, wenn man sie in Beziehung zu den durch die Hauptextraktion gewonnenen setzt. In den Nachextrakten der Methoden A, B, C, D und E reagieren noch Substanzen mit durchschnittlich 20 %, 40 %, 46 %, 49 % bzw. 36 % jener Werte, die im Hauptextrakt mit der S.P.V.-Reaktion als Gesamtlipid ermittelt wurden. Eine Deutung dieser unerwarteten Phänomene soll in der Diskussion versucht werden.

3) Gesamtcholesterinbestimmung

In 16 der nach den fünf Extraktionsmethoden gewon-

nenen Haupt- und Nachextrakte wurde das Gesamtcholesterin mit dem Eisenchloridreagens bestimmt. In Tabelle IX sind die in den Hauptextrakten erzielten Werte sowie die Verteilung der angestellten Versuche dargestellt. Dies ermöglicht den Vergleich mit den entsprechenden Gesamtlipidwerten in Tabelle VI. Es handelt sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Tabelle IX.

Vergleich der Gesamtcholesterinausbeute in den Hauptextrakten der fünf Extraktionsmethoden (mg%)

Versuch	Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E
1			0,384		
2			0,403		
3	0,468	0,422	0,386	0,429	0,426
4	0,470	0,430	0,396	0,429	0,414
5	0,464	0,427		0,427	0,421
Mittelwert	0,467	0,426	0,392	0,429	0,420

Die Gesamtcholesterinmittelwerte liegen mit 0,467 mg % für Methode A, 0,426 mg % für Methode B, 0,392 mg % für Methode C, 0,429 mg % für Methode D und 0,420 mg % für Methode E in einem Bereich von 0,467 mg % und 0,392 mg % und zeigen damit eine Differenz zwischen

höchstem und niedrigstem Wert von 0,075 mg %. Methode A bringt mit 0,467 mg % die höchste, Methode C mit 0,392 mg % die niedrigste Gesamtcholesterinausbeute. Dagegen zeigen Methode B, D und E etwa gleiche Ausbeuten, die einen mittleren Bereich einnehmen. Ein Vergleich dieser Werte mit den korrespondierenden Ergebnissen für Gesamtlipid (Tabelle VI) wird in der Diskussion gegeben.

In jedem der Nachextrakte der fünf Extraktionsmethoden zeigen sich bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (Bild 2 - 6) übereinstimmend an der Fließmittelfront Banden, die den Cholesterinfraktionen der Hauptextrakte entsprechen. Bei makroskopischer Beurteilung machen diese nach Schwärzungsintensität und Bandenfläche den größten Anteil aus. Es wurde versucht, diese Cholesterinmengen in den Nachextrakten mit der Eisenchloridreaktion quantitativ zu erfassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle X wiedergegeben, sie entsprechen den Hauptextraktcholesterinmengen in Tabelle IX. Es handelt sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Sie sind in der Einheit mg Gesamtcholesterin / Ausgangsmenge (20 ml) angegeben, stellen also die Absolutbeträge dar, die durch die jeweilige Nachextraktion noch erfaßt wurden und mit dem Eisenchloridreagens als Cholesterin reagierten.[x])

---

[x]) Aus Gründen, die in der Diskussion erörtert werden sollen, wurde auf eine Umrechnung dieser Werte in mg % verzichtet.

Tabelle X.

Vergleich der Gesamtcholesterinausbeute in den Nachextrakten der fünf Extraktionsmethoden (mg Gesamtcholesterin / Ausgangsmenge)

Versuch	Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E
1			0,0172		
2			0,0136		
3	0,008	0,0144	0,0228	0,0152	0,0118
4	0,0078	0,0154	0,0208	0,0160	0,0140
5	0,0082	0,0150		0,0150	0,0120
Mittelwert	0,008	0,015	0,019	0,016	0,013

Bei Methode C läßt sich in den Nachextrakten mit dem Eisenchloridreagens im Durchschnitt noch 0,019 mg, bei Methode A nur 0,008 mg Gesamtcholesterin nachweisen. Offensichtlich sind durch die Hauptextraktion bei Methode E durchschnittlich 0,013 mg, bei Methode B 0,015 mg und bei Methode D 0,016 mg Gesamtcholesterin nicht erfaßt worden. Methode A zeigt die höchste Ausbeute im Hauptextrakt (Tabelle IX) bei geringstem Cholesteringehalt im Nachextrakt. Entsprechend der geringsten Ausbeute durch die Hauptextraktion (Tabelle IX) bei Methode C läßt sich im korrespondierenden Nachextrakt der höchste Gesamtcholesteringehalt nachweisen. Ähnliche Beziehungen zeigen die Haupt- und

Nachextrakte der anderen Methoden, besonders die der Methode B. Die in den Nachextrakten noch nachweisbaren Cholesterinmengen bewegen sich zwischen 0,01 und 0,02 mg, d.h. bei einer Ausgangsmenge von 20 ml werden 0,01 - 0,02 mg Cholesterin durch die Hauptextraktion nicht erfaßt. In den Nachextrakten der Methoden A bis E sind demnach noch 8,5 %, 17,3 %, 23,9 %, 18,1 % bzw. 15,2 % der entsprechenden Hauptextraktgesamtcholesterinausbeute nachweisbar. Diese Mengen sind wesentlich geringer als die für das Gesamtlipid berechneten. Außerdem zeigt sich für das Gesamtcholesterin eine engere Relation zwischen den Haupt- und Nachextrakten. Eine detailliertere vergleichende Analyse dieser Ergebnisse soll in der Diskussion versucht werden.

4) Phosphorbestimmungen

In 15 der nach den fünf Extraktionsmethoden gewonnenen Haupt- und Nachextrakte wurde mit der beschriebenen Farbreaktion der "organisch gebundene" Phosphor bestimmt. In Tabelle XI sind die in den Hauptextrakten der Methoden A bis E erzielten Ergebnisse sowie die Verteilung der angestellten Versuche dargestellt. Dies ermöglicht den Vergleich mit den entsprechenden Werten für Gesamtlipid in Tabelle VI und Gesamtcholesterin in Tabelle IX. Es handelt sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Einer allgemeinen Gepflogenheit entsprechend, wird auf eine Berechnung

des Gesamtphospholipids in mg% verzichtet und nur der Gesamtphosphorgehalt in y% angeführt. Die Gesamtphosphormittelwerte der Hauptextrakte der fünf Extraktionsmethoden liegen mit 29,31 y% für Methode A, 27,95 y% für Methode B, 18,60 y% für Methode C, 28,80 y% für Methode D und 23,45 y% für Methode E in einem Bereich von 29,31 y% und 18,60 y% und zeigen damit eine Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert von 10,71 y%.

Tabelle XI.

Vergleich der Gesamtphosphorausbeute in den Hauptextrakten der fünf Extraktionsmethoden (y% Phosphor)

Versuch	Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E
1					
2					
3	29,28	27,60	18,62	29,30	23,47
4	28,53	27,97	20,30	28,30	21,70
5	30,13	28,30	16,90	28,82	25,20
Mittelwert	29,31	27,95	18,60	28,80	23,45

Methode A bringt mit 29,31 y% die höchste, Methode C und E mit 18,60 y% bzw. 23,45 y% die niedrigste Phosphorausbeute. Ähnlich hohe Werte wie Methode A erzielen mit 27,95 y% und 28,80 y% die Methoden B und D.

Neben der summarischen Bestimmung des "organisch gebundenen" Phosphors in den Hauptextrakten der fünf Extraktionsmethoden wurde durch die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen eine detailliertere Aufschlüsselung dieser Werte versucht. In Tabelle XII ist der Phosphorgehalt der von den Dünnschichtplatten zurückgewonnenen Phosphatidfraktionen in y% aufgeführt. Diesen Werten wird in Tabelle XIII die prozentuale Verteilung des Gesamtphosphors (Summe des Phosphorgehalts der Phosphatidfraktionen = 100 %, Tabelle XIV) auf die Phosphatidfraktionen in rel.% gegenübergestellt. Zum Vergleich mit den entsprechenden Werten für Gesamtlipid (Tabelle VI), Gesamtcholesterin (Tabelle IX) und Gesamtphosphor (Tabelle XI) ist jeweils die Versuchsnummer angegeben.

Übereinstimmend stellen bei den fünf Extraktionsmethoden Lecithin und Sphingomyelin die stärksten Fraktionen. Dagegen ist Lysolecithin bei Methode A, C und D und Kephalin bei Methode B und E die schwächste Fraktion. Die Lysolecithinwerte liegen in den Grenzen von 0,71 y% (Methode D) und 4,05 y% (Methode E) und zeigen damit eine Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert von 3,34 y%. Der Phosphorgehalt der Sphingomyelinfraktionen der Hauptextrakte der fünf Extraktionsmethoden stimmt mit einer Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert von 1,9 y% in

Tabelle XII.

Vergleich des Phosphorgehalts der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen der Hauptextrakte der fünf Extraktionsmethoden (y%)

Methode	Versuch	Lysolecithin	Sphingomyelin	Lecithin	Kephalin
A	3	0,71	5,35	16,81	2,14
	4	0,85	5,16	16,63	2,29
	5	0,60	5,53	16,98	1,95
	Mittelwert	0,72	5,34	16,80	2,12
B	3	2,70	5,60	15,35	0,85
	4	2,71	5,47	15,46	0,72
	5	2,75	5,30	15,60	0,55
	Mittelwert	2,72	5,45	15,47	0,70
C	3	0,87	3,57	10,41	1,32
	4	0,95	3,70	11,55	1,35
	5	0,75	3,40	9,30	1,25
	Mittelwert	0,85	3,55	10,42	1,30
D	3	0,70	5,20	16,70	2,15
	4	0,73	4,90	16,74	2,08
	5	0,70	5,07	16,72	2,10
	Mittelwert	0,71	5,05	16,72	2,11
E	3	4,06	4,34	6,86	0,74
	4	3,95	4,35	6,80	0,65
	5	4,15	4,35	6,95	0,85
	Mittelwert	4,05	4,35	6,87	0,75

engeren Grenzen überein. Die höchste Ausbeute erzielt mit 5,45 y% Methode B, die niedrigste mit 3,55 y% Methode C, wenn auch der prozentuale Phosphorgehalt

abelle XIII.

ergleich der prozentualen Verteilung des Gesamtphosphors auf die ünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen der auptextrakte der fünf Extraktionsmethoden (rel.%, Summe des Phosphorgehalts der Phosphatidfraktionen = 100 %, Tabelle XIV)

ethode	Versuch	Lysolecithin	Sphingomyelin	Lecithin	Kephalin
A	3	2,8	21,3	67,2	8,5
	4	3,4	20,7	66,7	9,2
	5	2,4	22,1	67,8	7,8
	Mittelwert	2,9	21,4	67,2	8,5
B	3	11,0	22,8	62,6	3,5
	4	11,1	22,4	63,4	2,9
	5	11,4	21,9	64,5	2,3
	Mittelwert	11,2	22,4	63,5	2,9
C	3	5,3	22,0	64,3	8,1
	4	5,4	21,1	65,8	7,7
	5	5,1	23,1	63,2	8,5
	Mittelwert	5,3	22,1	64,4	8,1
D	3	2,8	21,0	67,4	8,7
	4	3,0	20,0	68,4	8,5
	5	2,8	20,6	67,9	8,5
	Mittelwert	2,9	20,5	67,9	8,6
E	3	25,3	27,1	42,8	4,6
	4	25,1	27,7	43,2	4,1
	5	25,5	26,7	42,7	5,2
	Mittelwert	25,3	27,2	42,9	4,6

bei diesen Methoden mit 22,4 rel.% bzw. 22,1 rel.% gut übereinstimmt. Lecithin, die Fraktion mit dem größten Phosphorgehalt, liegt in einem Bereich von

16,80 y% (Methode A) und 6,87 y% (Methode E). Während bei Methode A, B und D fast übereinstimmende hohe Phosphorwerte gefunden werden, bringt Methode E mit 6,87 y% die Lecithinfraktion mit dem niedrigsten Phosphorgehalt. Die Kephalinfraktion zeigt eine Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert von 1,42 y%. Methode A und D erzielen mit 2,12 y% bzw. 2,11 y% die Kephalinfraktion mit dem höchsten, Methode B und E mit 0,70 y% bzw. 0,75 y% die Kephalinfraktion mit dem niedrigsten Phosphorgehalt. Während die Verteilung des Gesamtphosphors auf die vier Phosphatidfraktionen Lysolecithin, Sphingomyelin, Lecithin und Kephalin bei den Methoden A, B, C und D eine eindeutige Tendenz erkennen läßt, imponiert bei Methode E eine gewisse Nivellierung der Phosphorwerte. Durch eine beträchtliche Zunahme der Lysolecithinfraktion bei deutlicher Abnahme des Phosphorgehalts des Lecithins erscheinen bei dieser Methode die "Gipfel" der normalen Verteilung eingeebnet.

In Tabelle XIV werden die Gesamtphosphorwerte der Hauptextrakte der fünf Extraktionsmethoden aus Tabelle XI den dünnschichtchromatographisch zurückgewonnenen Gesamtphosphorwerten gegenübergestellt und daraus die Rückgewinnung in Prozent berechnet. Der von den Dünnschichtplatten zurückgewonnene Gesamtphosphor versteht sich als Summe des Phosphorgehalts der analy-

sierten Phosphatidfraktionen. Zum Vergleich mit den entsprechenden Werten für Gesamtlipid (Tabelle VI) und Gesamtcholesterin (Tabelle IX) ist jeweils die Versuchsnummer angegeben.

Tabelle XIV.

Gesamtphosphor in den Hauptextrakten (y%) - Gesamtphosphor von den Dünnschichtchromatographieplatten (y%) - und % Rückgewinnung

Meth.	Vers.	Hauptextraktgesamtphosphor Einzelbest.	Mittelw.	Plattengesamtphosphor Einzelbest.	Mittelw.	% Rückgewinnung
	3	29,28		25,01		
A	4	28,53	29,31	24,93	24,99	85,2
	5	30,13		25,05		
	3	27,60		24,50		
B	4	27,97	27,95	24,37	24,35	87,1
	5	28,30		24,20		
	3	18,62		16,17		
C	4	20,30	18,60	17,55	16,14	86,7
	5	16,90		14,70		
	3	29,30		24,75		
D	4	28,30	28,80	24,45	24,60	85,4
	5	28,82		24,59		
	3	23,47		16,00		
E	4	21,70	23,45	15,75	16,01	68,2
	5	25,20		16,30		

Der Hauptextrakt- und dünnschichtchromatographisch zurückgewonnene Gesamtphosphor zeigt bei Methode A, B und D gute Übereinstimmung, entsprechend liegt auch die Rückgewinnung in engen Grenzen (85,2 % Methode A, 87,1 % Methode B, 85,4 % Methode D). Die Phosphorrückgewinnung bei Methode C (86,7 %) liegt in der gleichen Größenordnung, bei gleichzeitiger Senkung beider Vergleichswerte blieb die Relation erhalten. Dagegen zeigt Methode E nur eine Phosphorrückgewinnung von 68,2 % entsprechend der Diskrepanz zwischen den Hauptextraktphosphorwerten und den nur niedrigen Gesamtphosphorwerten der analysierten Fraktionen.

In den Nachextrakten der fünf Extraktionsmethoden zeigen sich bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen in Höhe der Phosphatidfraktionen der Hauptextrakte mehr oder weniger deutlich ausgeprägte Schwärzungszonen. Der demnach in den korrespondierenden Nachextrakten noch nachweisbare "organisch gebundene" Phosphor wurde mit der beschriebenen Farbreaktion quantitativ erfaßt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XV dargestellt. Sie entsprechen den Hauptextraktgesamtphosphormengen in Tabelle XI. Es handelt sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, sie sind in der Einheit y Gesamtphosphor / Ausgangsmenge (20 ml) angegeben, stellen also den Absolutbetrag dar, der durch die Nachextraktion jeweils noch erfaßt wurde. x)

x) Aus Gründen, die in der Diskussion erörtert werden sollen, wurde auf eine Umrechnung dieser Werte in y% verzichtet.

Bei Methode B und C lassen sich in den Nachextrakten noch 2,85 γ bzw. 2,61 γ, bei Methode A und D nur 0,409 γ bzw. 0,31 γ Phosphor nachweisen. Bei Methode B sind offensichtlich 0,30 γ Phosphor durch die Hauptextraktion nicht erfaßt worden. Methode A zeigt bei höchster Ausbeute im Hauptextrakt (Tabelle XI) unter Methode D den niedrigsten Phosphorgehalt im Nachextrakt. Entsprechend der niedrigsten Hauptextraktausbeute (Tabelle XI) bei Methode C läßt sich im korrespondierenden Nachextrakt ein hoher Phosphorgehalt nachweisen. Ähnliche Beziehungen zwischen Haupt- und Nachextraktausbeute zeigt auch Methode B.

Tabelle XV.

Vergleich der Gesamtphosphorgehalte in den Nachextrakten der fünf Extraktionsmethoden. (γ Gesamtphosphor / Ansatzgemenge)

Versuch	Methode A	Methode B	Methode C	Methode D	Methode E
1					
2					
3	0,410	2,80	2,60	0,28	0,29
4	0,406	2,86	2,12	0,34	1,01
5	0,412	2,90	3,04	0,30	0,30
Mittelwert	0,409	2,85	2,81	0,31	0,30

Die in den Nachextrakten noch nachweisbaren Phosphormengen schwanken zwischen 0,3 und 3 y, d.h. bei einer Ausgangsmenge von 20 ml werden 0,3 - 3 y Phosphor durch die Hauptextraktion nicht erfaßt. In den Nachextrakten der Methoden A - E sind demnach noch 6,9 %, 50 %, 60 %, 5,4 % und 19 % der entsprechenden Hauptextraktgesamtphosphorausbeute enthalten. Besonders in den Nachextrakten der Methoden C und B lassen sich also noch beträchtliche Phosphormengen nachweisen. Eine Deutung dieser Phänomene soll in der Diskussion versucht werden.

Bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen stellen sich in jedem der Nachextrakte der fünf Extraktionsmethoden in den Positionen der Phosphatidfraktionen der Hauptextrakte Anschwärzungszonen dar. Die nur unzureichende Trennung in einzelne Banden läßt eine detailliertere Untersuchung der Phosphorverteilung auf einzelne Fraktionen, wie sie bei den Dünnschichtchromatogrammen der Hauptextrakte durchgeführt wurde (Tabelle XII, XIII), nicht zu. Der Phosphorgehalt dieser Anschwärzungszonen wurde daher summarisch bestimmt (y Phosphor / Ausgangsmenge (20 ml)), indem diese Felder wie beschrieben von den Platten abgehoben und jeweils zusammen analysiert wurden. Die so von den Dünnschichtplatten zurückgewonnenen Gesamtphosphorwerte der Nachextrakte der fünf

Extraktionsmethoden werden in Tabelle XVI den in den Nachextrakten direkt bestimmten Gesamtphosphorwerten (Tabelle XV) gegenübergestellt und daraus die Phosphorrückgewinnung in Prozent berechnet. Wie bereits erwähnt (Tabelle XV), lassen sich in den Nachextrakten der fünf Extraktionsmethoden bei direkter Bestimmung erhebliche Phosphormengen nachweisen, bei Methode C bis zu 60 % der Gesamtphosphorausbeute des korrespondierenden Hauptextraktes. Auch von den Dünnschichtchromatographieplatten lassen sich entsprechend den makroskopisch imponierenden Schwärzungszonen Phosphormengen gewinnen, die allerdings - und damit auch die jeweilige Phosphorrückgewinnung - wesentlich niedriger liegen als die in den Nachextrakten direkt bestimmten Werte. Sie schwanken zwischen 0,1 y Methode A und 0,8 y Methode C, die Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert beträgt 0,7 y. Methode B zeigt bei höchstem direkt bestimmten Nachextraktgesamtphosphorgehalt (2,85 y) und niedrigstem Plattengesamtphosphorgehalt (0,36 y) die geringste Phosphorrückgewinnung (12,6 %). Ähnliche Beziehungen zwischen dem direkt bestimmten Nachextraktgesamtphosphorgehalt und der korrespondierenden Phosphorrückgewinnung lassen sich auch für die anderen Methoden nachweisen: Die Phosphorrückgewinnung nimmt mit steigendem direkt bestimmten Nachextrakt-

gesamtphosphorgehalt ab. Eine Deutung dieses Phänomens soll in der Diskussion versucht werden.

Tabelle XVI.

Gesamtphosphor in den Nachextrakten (y Phosphor / Ausgangsmenge) - Gesamtphosphor von den Dünnschichtchromatographieplatten (y Phosphor / Ausgangsmenge) - und % Rückgewinnung

Meth.	Vers.	Nachextraktgesamtphosphor Einzelbest.	Mittelw.	Plattengesamtphosphor Einzelbest.	Mittelw.	% Rückgewinnun
	3	0,410		0,09		
A	4	0,406	0,409	0,08	0,10	24,3
	5	0,412		0,12		
	3	2,80		0,23		
B	4	2,86	2,85	0,38	0,36	12,6
	5	2,90		0,48		
	3	2,60		0,88		
C	4	2,18	2,61	1,12	0,87	33,3
	5	3,04		0,62		
	3	0,28		0,38		
D	4	0,34	0,31	0,23	0,30	96,7
	5	0,30		0,29		
	3	0,89		0,46		
E	4	1,01	0,90	0,51	0,44	48,8
	5	0,80		0,36		

IV. Diskussion

Zur vergleichenden Analyse der Ergebnisse werden in Tabelle XVII zunächst die wesentlichen Charakteristika der fünf Extraktionsmethoden zusammengefaßt. Die Extraktionsdauer beträgt maximal 5 Stunden, mindestens 3 Stunden. Bedeutsamer als die absolute Dauer ist der tatsächliche zeitliche Aufwand bzw. die sogenannten freien Intervalle. So arbeitet z.B. Methode A durch zweimal zweistündliches "Schütteln" gleichsam ohne jedes Zutun, entsprechend groß ist die freie Zeit für andere Laborarbeiten. Dagegen ist bei den anderen Methoden - besonders bei Methode C - durch zahlreiche Manipulationen bei etwa gleicher absoluter Dauer diese Zeit voll ausgefüllt; etwa durch Einengen des Liquors zu Beginn der Extraktion - Methode C und E -, mehrmaliges Einengen der Extrakte - Methode C, D und E - bzw. durch mehr als zweimalige Extraktion der wässrigen bzw. eingeengten trockenen Phasen (Extraktionsfrequenz in Tabelle XVII) - Methode C, D und E. Entsprechend groß ist bei diesen Methoden der Aufwand an Glasgeräten. Bei nur nach praktischen Gesichtspunkten orientierter Betrachtung hat also Methode A den Vorteil des relativ langen freien Intervalls. Wie aus Tabelle XVII hervorgeht, wird bei Methode B zur Fällung der proteingebundenen Lipoide Säure (Trichloressigsäure 50 %) zugesetzt, bei Methode D und besonders bei Methode E mehrmals mit heißen Lösungsmittel-

gemischen extrahiert und bei Methode B wie auch C und D zum Auswaschen wasserlöslichen Materials reines bzw. salzhaltiges Wasser zugesetzt, Manipulationen, welche die Lipidausbeute nicht unbeeinflußt lassen.

Tabelle XVII.

Vergleich der wesentlichen Charakteristika der fünf Extraktionsmethoden

Meth.	Dauer (Std.)	Säure-zusatz	Erhitzen	Wasser-zusatz	Extraktions-frequenz	apparat. Aufwand	Einengen Liquor	Einengen Extrakt
A	5	./.	./.	./.	2 x	./.	./.	./.
B	5	+	./.	+	2 x	./.	./.	./.
C	4 1/2	./.	./.	+	6 x	+++	+	+++
D	3	./.	++	++	3 x	+	./.	+
E	3	./.	++	./.	4 x	./.	+	+

In Tabelle XVIII werden die in den Hauptextrakten der fünf Extraktionsmethoden erzielten Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin- und Gesamtphosphorausbeuten (Tabelle VI, IX und XI) vergleichend gegenübergestellt. Es zeigt sich eine durchgehende Tendenz. Methode A bringt sowohl für Gesamtlipid, als auch für Gesamtcholesterin und Gesamtphosphor die höchsten Ausbeuten, während Methode C die niedrigsten Werte für diese Fraktionen erzielt. Gute Übereinstimmung und einen mittleren Bereich zwischen Methode A und C einnehmend

zeigen die mit den Methoden B und D erzielten Werte. Dagegen liegen die mit Methode E gewonnenen Werte durchgehend niedriger, d.h. der Gesamtlipid-, weniger der Gesamtcholesterin- und wieder mehr der Gesamtphosphorausbeute der Methode C benachbart. Bei dieser Methode dürften durch die zahlreichen Manipulationen, wie Einengen des Liquors, mehrmaliges Einengen der Extrakte, durch die hohe Extraktionsfrequenz, Auswaschen der Extrakte und den dadurch bedingten großen Aufwand an Gefäßen Lipidmengen verlorengehen.

Tabelle XVIII.

Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin- und Gesamtphosphorausbeute in den Hauptextrakten der fünf Extraktionsmethoden (mg% bzw. y%)

Meth.	Gesamtlipid (mg%)	Gesamtcholesterin (mg%)	Gesamtphosphor (y%)
A	2,35	0,467	29,31
B	2,25	0,426	27,95
C	1,84	0,392	18,60
D	2,19	0,429	28,80
E	1,84	0,420	23,45

Die mit den fünf Extraktionsmethoden gefundenen Gesamtlipid- und Gesamtcholesterinwerte stimmen in der Größenordnung mit den Normalwerten verschiedener Autoren (Tabelle III und IV) überein. ROBOZ et al. (30)

fanden z.B. 2,5 mg% Gesamtlipid und 0,400 mg% Gesamtcholesterin, Methode D, nach welcher diese Autoren extrahierten, ergab 2,19 mg% bzw. 0,429 mg%. Sie bestimmten allerdings das Gesamtlipid wie auch das Gesamtcholesterin nach anderen Methoden. Vergleichbare Gesamtlipid- bzw. Gesamtcholesterinwerte für die Methoden A, B, C und E liegen in der Literatur nicht vor. Die nach den fünf Extraktionsmethoden in den Hauptextrakten direkt gewonnenen Gesamtphosphorwerte liegen höher als die von verschiedenen Autoren mitgeteilten (Tabelle V). TOURTELLOTTE et al. (44) fanden z.B. nur 16 y% organisch gebundenen Phosphor, bei allerdings auch sonst niedrigen Werten für die anderen Lipidfraktionen. McARDLE und ZILKHA (22) - vergleichbar mit Methode B - und PHILLIPS und ROBINSON (25) - vergleichbar mit Methode C - bestimmten den lipoidgebundenen Phosphoranteil mit 15 y% bzw. 17 y%. Es handelt sich hierbei allerdings um den papier- bzw. dünnschichtchromatographisch zurückgewonnenen Gesamtphosphor, d.h. um chromatographisch gereinigten Phosphatidphosphor, denn beide Autoren bestimmten den Phosphorgehalt nicht direkt in den Extrakten. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß man bedenken, daß der anorganische Phosphoranteil im Liquor 60 mal höher liegt (1,4 mg% nach ODESSKY (23)) als der organisch gebundene. Es könnte immerhin sein, daß in den Gesamtextrakt Spuren von anorganischem Phosphor gelangen, was den Phosphorgehalt wesentlich erhöhen

würde. Bei direkter Bestimmung im Extrakt fanden ROBOZ et al. (30) immerhin einen Phosphatidphosphorgehalt von 31 y%, ein Wert, der mit dem nach Methode D (nach dieser Methode extrahierten ROBOZ et al.) ermittelten von 28,8 y% gut übereinstimmt. Für Methode A und E liegen vergleichbare Lipoidphosphorwerte in der Literatur nicht vor.

Es läßt sich also eine gewisse Abhängigkeit der Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin- und Gesamtlipoidphosphorausbeute von den Extraktionsmethoden nachweisen. Die Differenz zwischen Maximal- und Minimalwert (Methode A - Methode C) für Gesamtlipid, Gesamtcholesterin und Gesamtphosphatidphosphor beträgt 0,5 mg%, 0,07 mg% bzw. 0,01 mg%; zweifellos bedeutsame Unterschiede, welche zwar die sehr unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Autoren kaum erklären können (Tabelle III, IV und V), aber immerhin zeigen, daß die untersuchten Extraktionsmethoden die Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin- und Gesamtphosphatidphosphorausbeute doch in ziemlich großem Maße beeinflussen.

Lipidstrukturen sind von außerordentlicher Vielfalt, einer Vielfalt, welche den Variationsmöglichkeiten der Protein- und Nukleinsäurestrukturen vielleicht nahe kommt. Gegenstand neuerer Forschungen über die Lipidzusammensetzung des Liquors ist daher nicht mehr so sehr die summarische Erfassung heterogener

Lipidgruppen wie des Gesamtlipids, Gesamtcholesterins oder der Gesamtphosphatide, sondern vielmehr die quantitative Bestimmung möglichst rein dargestellter Lipidfraktionen. Auf den Gehalt an solchen reinen Fraktionen bleiben die fünf Extraktionsmethoden, wie Tabelle XIX für die untersuchten Phosphatide zeigt, ebenfalls nicht ohne Einfluß. In dieser Tabelle ist die Verteilung des Gesamtphosphors auf die dünnschichtchromatographisch gewonnenen Fraktionen der Hauptextrakte der fünf Extraktionsmethoden (Tabelle XIII) in rel.% vergleichend gegenübergestellt. Beste Übereinstimmung in der Verteilung des Gesamtphosphors auf die vier Phosphatidfraktionen zeigen Methode A und D, ähnliche Verhältnisse liegen bei Methode C vor. Dagegen heben sich die mit Methode B und E erzielten Werte von dieser Verteilung deutlich ab. Sphingomyelin ist bei den fünf Extraktionsmethoden die Phosphatidfraktion mit der größten Übereinstimmung, differierende Ergebnisse finden sich für Kephalin und besonders für Lecithin und Lysolecithin bei Methode B und E, weniger auch bei C. Bei diesen Methoden kommt es gegenüber Methode A und D zu einer Zunahme des Lysolecithinanteils auf Kosten der Lecithin- und weniger auch der Kephalinfraktion.

Bei Methode B besteht die Möglichkeit einer Säurehydrolyse, bei Methode C und besonders bei E die eines Abbaus während des Einengens des Liquors bzw.

der Extraktion mit heißen Lösungsmitteln (Tabelle XVII), dies könnte die erhöhten Lysolecithin- bzw. erniedrigten Lecithinwerte erklären. Während Methode E auf jedes Auswaschen des Extraktes verzichtet, wird bei Methode B eine Entfernung wasserlöslichen Materials durch Zusatz von Wasser versucht (Tabelle XVII). Da Lysolecithin wasserlöslich ist, könnten wenigstens teilweise auch auf diese Weise die besonders hohen Lysolecithinwerte bei Methode E zustande kommen. Ähnlich müssen die Ergebnisse der Methode C interpretiert werden.

Tabelle XIX.

Vergleich des Phosphorgehalts der dünnschichtchromatographisch getrennten Phosphatidfraktionen der fünf Extraktionsmethoden (rel.%)

Meth.	Lysolecithin	Sphingomyelin	Lecithin	Kephalin
A	2,9	21,4	67,2	8,5
B	11,2	22,4	63,5	2,9
C	5,3	22,1	64,4	8,1
D	2,9	20,5	67,9	8,6
E	25,3	27,2	42,9	4,6

Die nach den fünf Extraktionsmethoden ermittelten Werte für die Phosphatidfraktionen stimmen in der Größenordnung mit den Normalwerten verschiedener

[illegible] (Tabelle I) ähnelte nach Lösung mit Schwefelsäure die primäre Fraktion und zeigte Analogie mit der neuen Unterteilung, gekennzeichnet von Kephalin und Lysolezithin. Der Kephalinfraktion (a') entsprach eine Bande wie die Kephalin. Die gleiche hohe Lysolezithinempfindlichkeit wie unsere 3 Hefen mit Ausnahme von [illegible] (IX), die wir oben dieser Gruppe zuordneten. Die Angaben von [illegible] und [illegible] (II) sind mit den nach Methode I erhaltenen, mit welcher diese Autoren arbeiteten, vergleichbar. Die Methode A, B und I haben offensichtlich Verschiedenheiten in der Extraktion, Zusammensetzung und Lage der Lipide ergeben, was demnach das Phosphatidgehaltsbild der Hefen entscheidend ändert. Ebenso war offensichtlich die Besonderheit der Methode B und A durch unterschiedlich modifiziert wird.

Dieses war bereits die Summe der Phosphatidfraktionen der Hefenarten der fünf Extraktionsmethoden noch beträchtliche Lücken zu überbrücken, Gesamtcholesterin und Phosphatiden miteinbezogen vermuten, so ergibt auch die quantitative Erfassung dieser Lipidgruppen in den Hefenarten übereinstimmend hohe Werte. In Tabelle XI sind die zu den korrespondierenden Hefenarten noch die Gesamtlipid, Gesamtcholesterin bzw. die "organisch gebundenen" Phosphor-Gehalten aus Tabelle VIII, X und XV in mg bzw. g /

Ausgangsmenge (20 ml) vergleichend gegenübergestellt. Danach werden bei einer Ausgangsmenge von 20 ml 0,1 mg - 0,2 mg Gesamtlipid, 0,01 mg - 0,02 mg Gesamtcholesterin bzw. 0,0003 mg - 0,003 mg Gesamtphosphor durch die Hauptextraktion nicht erfaßt, d.h. in den Nachextrakten reagieren noch 20 - 49 % der Hauptextraktausbeute als Gesamtlipid, 8 - 24 % als Gesamtcholesterin und 6 - 60 % als Gesamtphosphor, also recht beträchtliche Mengen.

Tabelle XX.

Noch als Gesamtlipid, Gesamtcholesterin und Gesamtphosphor reagierende Mengen in den Nachextrakten der fünf Extraktionsmethoden (mg bzw. y / Ausgangsmenge)

Meth.	Gesamtlipid (mg/20 ml)	Gesamtcholesterin (mg/20 ml)	Gesamtphosphor (y/20 ml)
A	0,095	0,008	0,409
B	0,182	0,015	2,85
C	0,174	0,019	2,61
D	0,220	0,016	0,31
E	0,138	0,013	0,90
höchster	0,1 mg	0,01 mg	0,0003 mg
niedrigster Wert	0,2 mg	0,02 mg	0,003 mg

Dabei zeigt sich eine gewisse Tendenz insofern als z.B. bei Methode A und D bei durchgehend hohen Gesamt-

lipid-, Gesamtcholesterin- und Gesamtphosphorausbeuten in den Hauptextrakten (Tabelle XVIII) die in den korrespondierenden Nachextrakten noch nachweisbaren Mengen entsprechend niedrig, bzw. bei Methode C mit durchgehend niedrigen Hauptextraktausbeuten die in den entsprechenden Nachextrakten noch reagierenden Mengen besonders hoch liegen. Andererseits nimmt z.B. die Phosphorrückgewinnung von den Dünnschichtchromatographieplatten der Nachextrakte mit steigendem direkt bestimmten Nachextraktphosphorgehalt ab (Tabelle XVI). Diese Relationen könnten zur Klärung der Frage beitragen, inwieweit es sich bei dem in den Nachextrakten noch reagierenden Material tatsächlich um Lipid, Cholesterin bzw. Lipoidphosphor handelt.

CURTIS und SEIPEL (9) konnten im Ultrazentrifugat von Chloroform-Methanol Extrakten mit der Biuretreaktion Protein nachweisen. Nach MARINETTI et al. (21) enthalten Chloroform-Methanol Extrakte in variabler Menge wasserlösliche Orthophosphate, Mononucleotide und zuckergebundenen Phosphor, nach PHILLIPS und ROBINSON (25) Monoglyceride, Salze, Proteine und niedere Fettsäuren. Die Art der Nachextraktion, bei der die wässrigen Phasen bzw. das Sediment der Hauptextrakte noch zweimal mit der dreifachen Lösungsmittelmenge nachextrahiert wurde, bedingt einen größeren Gehalt an diesen Substanz-

gruppen. Die Sulfophosphovanillinmethode als unspezifische Lipidreaktion wird aber allein schon durch Bräunung, hervorgerufen durch Reaktion der Schwefelsäure mit diesen Substanzgruppen, verfälscht, abgesehen von einer Reaktion des Farbreagens mit Oxy-, Mono-, Dicarbonsäuren und Ketonen. Die Eisenchloridreaktion zum Nachweis von Cholesterin zeigt nach ZLATKIS et al. (52) durch Interferenz mit Proteinen zumindest unterhalb von 560 mμ beträchtliche unspezifische Extinktionswerte. Die von BARTLETT (2) angegebene Methode zur Phosphorbestimmung erfaßt selbstverständlich den Gesamtphosphor, nicht nur den lipoidgebundenen. Letzteres könnte die nur niedrige dünnschichtchromatographische Phosphorrückgewinnung in den Nachextrakten erklären (Tabelle XVI), da hierbei nur der durch die Dünnschichtchromatographie gleichsam nochmals gereinigte Phosphatidphosphor berücksichtigt wird. Macht man z.B. diese Werte und nicht die in den Nachextrakten direkt bestimmten Phosphorbeträge zur Grundlage der Berechnung, so findet man in den Nachextrakten der Methoden A - E nicht mehr 6,9 %, 50 %, 60 %, 5,4 % bzw. 19 % der betreffenden Hauptextraktgesamtphosphorausbeute, sondern nur noch 1,7 %, 6,4 %, 23,3 %, 5,2 % und 9,2 %. Man darf also annehmen, daß es sich bei dem in den Nachextrakten noch als Gesamtlipid, Gesamtcholesterin bzw. Lipoidphosphor reagierenden Material nur zum Teil um Lipid handelt. Aus diesem

Grund schien eine Umrechnung der Werte in mg% bzw. y% nicht angebracht. Nichtsdestoweniger ist in den Nachextrakten, wie die Dünnschichtchromatogramme eindrucksvoll demonstrieren, noch Cholesterin und Phosphatid und damit auch Gesamtlipid enthalten. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Befunden gibt z.B. WEICKER (49) mit den üblichen Extraktionsmethoden eine Lipidausbeute von 70 - 80 % an. Keine der untersuchten Extraktionsmethoden wirkt demnach quantitativ bzw. selektiv, am ehesten noch Methode A, am wenigsten Methode C.

Abschließend noch wenige Worte zu den "Normalwerten" einzelner Lipidfraktionen im Liquor cerebrospinalis. Nach den zur Zeit vorliegenden, noch unveröffentlichten Untersuchungsergebnissen von SCHRAPPE, STÖCKERT, WAGENHOFF und SCHOLZ (34) an über 100 Liquoren lassen sich Normalwerte für einzelne Lipide wahrscheinlich überhaupt nicht - beispielsweise analog von Serumlipidwerten - angeben. Zur Differenzierung von normalen und pathologisch veränderten Liquoren ist man vielmehr gezwungen, Relationen zwischen einzelnen Lipiden zu errechnen. Es scheinen sich hierbei vor allem die relativen Werte von Phosphorlipidgehalt bzw. Gehalt an freiem Cholesterin, bezogen auf Estercholesterin, zu bewähren.

C) Zusammenfassung

Der Einfluß verschiedener Extraktionsmethoden auf die Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin-, Gesamtphosphatid-, Sphingomyelin-, Kephalin-, Lecithin- und Lysolecithinausbeute im Liquor cerebrospinalis wird untersucht bei gleichzeitiger Berücksichtigung praktischer Gesichtspunkte.

Gleiche Mengen eines in Wasser gelösten gefriergetrockneten Sammelliquors werden nach fünf in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden extrahiert und nach einem Standardprogramm Nachextrakte angefertigt. In den Haupt- und Nachextrakten sowie von den Dünnschichtchromatogrammen der Haupt- und Nachextrakte werden die genannten Lipidfraktionen quantitativ bestimmt.

1) Nach Methode A werden die höchsten, nach Methode C die niedrigsten Gesamtlipid-, Gesamtcholesterin- und Gesamtphosphorwerte erzielt. Mittlere Ausbeuten bringen Methode B und D, niedrige Methode E.

2) Die unterschiedlichen Ergebnisse können die Differenzen zwischen den Normalwerten einzelner Autoren für diese Lipidfraktionen nicht erklären.

3) Extraktionsmethoden, bei welchen das Ausgangsmaterial eingeengt, erhitzt bzw. mit Säure behandelt

oder zum Extrakt Wasser zugesetzt wird, modifizieren das Phosphatidspektrum des Liquor cerebrospinalis nicht unerheblich.

4) Keine der geprüften Extraktionsmethoden wirkt quantitativ bzw. selektiv, am ehesten noch Methode A, am wenigsten Methode C. Entsprechend lassen sich in allen Nachextrakten noch variable Lipidmengen nachweisen.

5) Der tatsächliche zeitliche und apparative Aufwand ist bei einer absoluten Dauer von 5 Stunden bei Methode A am geringsten, bei einer absoluten Dauer von 4 1/2 Stunden bei Methode C am größten.

6) Die Methode A ist also nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung den anderen Methoden vorzuziehen und kann für die Extraktion von Liquorlipiden nachdrücklich empfohlen werden.

D) Anhang

Apparate und Geräte: Gefriertrocknung

Gefriertrocknungsanlage der Firma W.K.F., Gesellschaft für Elektrophysikalischen Apparatebau, Deutschland.

Prüfsieb, 0,09 mm, nach DIN 4188

Apparate, Geräte und Reagentien: Extraktion

Bottle shaker, International Equipment Co., Boston, Mass., Vertretung in Deutschland: Firma Ludwig Hormuth, Heidelberg-Wiesloch.

Rotationsverdampfer der Firma Buchi, Glasapparatefabrik Flawil.

Zentrifuge der Firma Stock, Marburg/Lahn.

Wasserbad mit Thermostat und Stickstoffstrom.

Saugpipetten, die Enden fein ausgezogen, zum Ansaugen mit einem Gummihütchen versehen.

Filterpapier der Firma Binzer, Hatzfeld/Eder, entfettet.

Scheidetrichter in verschiedenen Größen.

Rundkolben (50 ml) mit Glasschliffstopfen (N.S. 29/32).

Meßkolben (25 ml) mit Glasschliffstopfen (N.S. 10).

Große Zentrifugengläser (etwa 40 ml) mit Glasschliffstopfen (N.S. 19/24).

H_2O, an Ionenaustauschsäule gereinigt, Reinheitsgrad mindestens 0,5 µS.

Chloroform, p.a., Firma Merck.

Methanol, p.a., Firma Merck.

Chloroform : Methanol 1:1, 2:1, 1:3 (v/v).

Chloroform : Methanol 2:1 mit 4 % Wassergehalt.

Trichloressigsäure, für Analyse und für Chromatographie, Firma Riedel-De Haën AG.

Trichloressigsäure 50 % (w/v).

KCl, Kaliumchlorid für Analyse, Firma Riedel-De Haën AG.

0,1 m KCl Lösung.

1:5 (0,1 m KCl) : (Chloroform : Methanol (2:1)).

Chloroform : Methanol gesättigte $CaCl_2$Lösung nach ROBOZ et al. (30):

$CaCl_2$, entwässert, gekörnt, Firma Riedel-De Haën AG.
Wässrige $CaCl_2$Lösung (20 mg/100 ml)
Chloroform : Methanol 2:1

In einem Scheidetrichter werden 96,3 ml Chloroform : Methanol (2:1) und 23,7 ml $CaCl_2$Lösung (20 mg/100 ml) geschüttelt. Nach Absetzen der zwei Phasen wird die obere gewonnen.

Apparate, Geräte und Reagentien: Gesamtlipidbestimmung

Wasserbad mit Thermostat und Stickstoffstrom.

Photometer Eppendorf, 1 cm Küvetten, Filter 546 mμ

Konische Zentrifugengläser (15 ml) mit Glasschliffstopfen (N.S. 14,5).

Glasstäbe, am Ende breitgedrückt, zum Mischen.

Schwefelsäure, p.a., Dichte 1,83, Firma Merck.

Vanillin, D.A.B. 6, Firma Merck.

Orthophosphorsäure, Dichte 1,70, Firma Riedel-De Haën AG.

Phosphorsäure : Vanillin Reagens:

4 Teile Phosphorsäure, 1 Teil Vanillinlösung, 0,6 %, in dunkler Flasche mindestens 2 Wochen haltbar.

Cholesterin, chem. rein, Firma Riedel-De Haën AG.

Cholesterinstandardlösung:

25 mg Cholesterin in 250 ml Chloroform.

Apparate, Geräte und Reagentien: Gesamtcholesterinbestimmung

Wasserbad mit Thermostat und Stickstoffstrom.

Photometer Eppendorf, 1 cm Küvetten, Filter 546 mμ

Reagensgläser.

Glasstäbe, am Ende breitgedrückt, zum Mischen.

Vakuumexsiccator, Firma Haraeus G.m.b.H., Hanau.

Essigsäure, p.a., 99 - 100 % (Eisessig), Firma Riedel-De Haën AG.

Eisenchlorid, $FeCl_3 \times 6\ H_2O$, p.a., Firma Merck.

Schwefelsäure, p.a., Dichte 1,83, Firma Merck.

Farbreagens:

1 g $FeCl_3$ in 10 ml Eisessig lösen, davon 1 ml mit konzentrierter Schwefelsäure auf 100 ml auffüllen. In dunkler Flasche etwa 8 Tage haltbar.

Cholesterin, chem. rein, Firma Riedel-De Haën AG.

Cholesterinstandardlösung:

25 mg Cholesterin in 250 ml Chloroform.

Apparate, Geräte und Reagentien: Dünnschichtchromatographie

Beschichtungsgerät der Firma Shandon, Frankfurt/M.

Glasplatten 20 x 20 cm.

Kieselgel, H.R., reinst nach Stahl für Dünnschichtchromatographie, Firma Merck.

30 g Kieselgel in 65 ml H_2O genügen zur Beschichtung von 5 Platten. Schichtdicke 0,2 mm.

Trockenschrank, Firma Haraeus G.m.b.H., Hanau.

Shandonexsiccator mit $CaCl_2$.

Gläser mit ausgezogener Spitze = Spitzgläser (55/15).

Wasserbad mit Thermostat und Stickstoffstrom.

Mikrospritze zum Auftragen, sample jector der Scientific Kit Company, washington. (25 Microliter).

Shandon T.L.C. Chromatank, Firma Shandon, Frankfurt/M., ausgeschlagen mit Fließpapier.

Methanol, p.a., Firma Merck.

Chloroform, p.a., Firma Merck.

H_2O, an Ionenaustauschsäule gereinigt, Reinheitsgrad mindestens 0,5 μS.

Ammoniak, Liquor Ammonii caustici, p.a., Firma Merck.

Fließmittel:

Chloroform : Methanol : Wasser : Ammoniak,
65 ml : 25 ml : 3 ml : 1 ml.

Schwefelsäure 50 %.

Spray-Flasche, Shandon Laboratory Spray Gun, No. 2046, Frankfurt/M.

Apparate, Geräte und Reagentien: Phosphorbestimmung

Wasserbad mit Thermostat und Stickstoffstrom.

Trockenschrank, Firma Haraeus G.m.b.H., Hanau.

Zentrifuge der Firma Stock, Marburg/Lahn.

Analysenwaage, Firma E. Mettler, Zürich.

Kleiner Spatel, feiner Haarpinsel.

Zeiss Spektrometer, 1 cm Küvetten, Filter 760 nm.

Konische Zentrifugengläser (15 ml) mit Glasschliffstopfen (N.S. 14,5).

H_2O, an Ionenaustauschsäule gereinigt, Reinheitsgrad mindestens 0,5 µS.

Kaliumdihydrogenphosphat nach Sorensen, KH_2PO_4, p.a., Firma Merck.

Phosphorstandardlösung:

> 219,7 mg KH_2PO_4 auf 500 ml auffüllen, davon 10 ml auf 100 ml auffüllen. 1 ml dieser Lösung enthält 10 y Phosphor.

Perchlorsäure, $HClO_4$, Firma Merck.

Schwefelsäure, H_2SO_4, Firma Merck.

Veraschungsgemisch:

> Zu 20 ml 70 %iger Perchlorsäure werden 355 ml H_2O und 125 ml 20 N H_2SO_4 gegeben.

Ammoniummolybdat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$, zur Analyse, Firma Merck.

Ammoniummolybdatlösung:

> 5 g Ammoniummolybdat werden in 404 g H_2O gelöst.

Natriumdisulfit, $Na_2S_2O_5$, zur Analyse, Firma Riedel-De Haën AG.

1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfosäure zur Phosphorbestimmung im Blutserum nach Siwe, Firma Riedel-De Haën AG.

Natriumsulfit, Na_2SO_3, wasserfrei zur Analyse, Firma Merck.

Farbreagens:

> 6,85 g Natriumpyrosulfit werden in 50 ml H_2O gelöst und unter Schütteln 125 mg 1-Amino-2-Naphtol-4-Sulfosäure zugesetzt. Tropfenweise eine Lösung von 1,5 g Natriumsulfit in 5 ml H_2O zugeben bis Trübung verschwindet und anschließend filtrieren.

E) Literaturverzeichnis

1) Albers, W. und O.H. Lowry: Fluorometric Determination Of 0,1 - 10 Micrograms Of Cholesterol. Anal. Chem. 27, 1829 - 1831 (1955)

2) Bartlett, G.R.: Phosphorus Assay In Column Chromatography, J. Biol. 234, 466 - 468 (1959)

3) Blomstrand, R., S.J. Dencker und B. Swahn: The Fatty Acid Profile Of Cerebrospinal Fluid. Kungl. Fysiograf. Sällskapets I Lund Förhand 30, 21 - 26 (1960)

4) Blomstrand, R. und F. Nakayama: Neutron Activation Paper Chromatographic Analysis Of Human Cerebrospinal Fluid. J. Neurochem. 8, 230 - 233 (1961)

5) Chabrol, E. und R. Charonnat: Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides. Presse méd. 45, 1713 - 1714 (1937)

6) Chabrol, E., M. Böszörményi und P. Fallot: Les lipides du sérum sanguin sous l'angle de la réaction sulfo-phospho-vanillique. Sem. Hôp. Paris 25, 3446 - 3452 (1949)

7) Christensen Lou, H.O und J. Matzke: Cerebroside And Other Polar Lipids Of The Cerebrospinal Fluid In Neurological Diseases. Acta Neurol. Scand. 41 445 - 447 (1965)

8) Costello, R.L. und G.L. Curran: Modified Turbidimetric Procedure For Determination Of Cholesterol. Am. J. Clin. Path. 27, 108 - 111 (1957)

9) Curtis, W.C. und J.H. Seipel: Determination Of Total Lipid In The Cerebrospinal Fluid By Paper Chromatography. J. Neurochem. 6, 318 - 326 (1961)

10) Dieckhoff, J. und R. Koch: Zuckerhaltige Lipoide im Liquor cerebrospinalis unter normalen und pathologischen Bedingungen im Kindesalter. Ann. Paediat. (Basel) 188, 1 - 15 (1957)

11) Farstad, M.: Determination Of Fatty Acids In Cerebrospinal Fluid. II. Qualitative And Quantitative Studies By A Combination Of Alkali Titration And Gas Chromatography. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16, 139 - 144 (1964)

12) Farstad, M.: Determination Of Fatty Acids In Cerebrospinal Fluid. III. Quantitative And Qualitative Studies In Some Neurological And Psychiatric Disorders. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 16, 554 - 558 (1964)

13) Farstad, M.: Determination Of Fatty Acids In Cerebrospinal Fluid. IV. The Fatty Acid Content Of The Major Lipid Fractions And The Total Fatty Acid Esters Of Cerebrospinal Fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, 336 - 340 (1965)

14) Fiske, C.H. und Y.J. Subbarow: The Colorimetric Determination Of Phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375 - 400 (1925)

15) Folch, J., M. Lees und G.H.S. Stanley: A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipids From Animal Tissues. J. Biol. Chem. 226, 497 - 509 (1957)

16) Janbon, M., L. Bertrand und P. Izarn: Hyperlipidorachie dans un cas de neuromyélite optique. Rev. Neurol. 81, 740 - 746 (1949)

17) Lafontaine, A.: A propos des lipides humoraux autres que les phosphatides totaux dans certaines affections neurologiques. J. Belge Neurol. Psychiat. 47, 199 - 204 (1947)

18) LeBaron, F.N. und J. Folch: Structure Of Brain Tissue Lipids. Physiol. Rev. 37, 539 - 545 (1957)

19) Lier, H.: Untersuchungen über den Lipoidgehalt des Liquors. Allg. Z. Psychiat. 115, 336 - 341 (1940)

20) Mangold, A.K.: Thin-Layer Chromatography Of Lipids. J. Am. Oil. Chem. Soc. 41, 762 - 773 (1964)

21) Marinetti, G.V., M. Albrecht, T. Ford und E. Stotz: Analysis Of Human Plasma Phosphatides By Paper Chromatography. Biochim. Biophys. Acta 36, 4 - 13 (1959)

22) McArdle, B. und K.J. Zilkha: The Phospholipid Composition Of Cerebrospinal Fluid In Neurological Disorders. Brain 85, 389 - 402 (1962)

23) Odessky, L., Ph. Rosenblatt, A.V. Bedo und L. Landau: Cerebrospinal Fluid Inorganic Phosphorus In Normal Individuals And In Those With Viral Involvement Of The Central Nervous System. J. Lab. Clin. Med. 41, 745 - 753 (1953)

24) Papadopoulos, M.M., W. Cevallos und W.C. Hess: Determination Of Phospholipids In Spinal Fluid And Brain. Arch. Neurol. 3, 677 - 682 (1960)

25) Phillips, B.M. und N. Robinson: Quantitative Thin Layer Chromatography Of Cerebrospinal Fluid Phospholipids. Clin. Chim. Acta 8, 832 - 842 (1963)

26) Pighini, G.: Über den Cholesteringehalt der Lumbalflüssigkeit einiger Geisteskrankheiten. Z. Physiol. Chem. 61, 508 - 512 (1909)

27) Pilz, H. und E. Frick: Dünnschichtchromatographische Lipoidmuster vom normalen menschlichen Serum und Liquor cerebrospinalis. Klin. Wschr. 13, 780 - 786 (1966)

28) Plaut, F. und H. Rudy: Untersuchungen über den Cholesteringehalt des Liquor cerebrospinalis. Z. ges. Neurol. Psychiat. 146, 229 - 261 (1933)

29) Poser, C.M. und G.L. Curran: Cerebrospinal Fluid Free Cholesterol As Index Of Activity Of Multiple Sclerosis And Allied Diseases. Arch. Neurol. Psychiat. 80, 304 - 312 (1958)

30) Roboz, E., W.C. Hess, R.R. DiNella und W. Cevallos: Determination Of Total Lipids, Cholesterol And Phospholipids In Cerebrospinal Fluid. J. Lab. Clin. Med. 52, 158 - 162 (1958)

31) Roeder, F.: Über das Lipoidproblem des Liquor cerebrospinalis. Z. ges. Neurol. Psychiat. 168, 519 - 524 (1940)

32) Schlossberger, H.: Analyse von hydrocephalischen Flüssigkeiten. Arch. Physiol. Heilk. 10, 518 - 524 (1851). Zitiert nach Poser, Ch.M. und G.L. Curran: Cerebrospinal Fluid Free Cholesterol As Index Of Activity Of Multiple Sclerosis And Allied Diseases. Arch. Neurol. Psychiat. 80, 304 - 312 (1958)

33) Schrappe, O. und H.G. Stöckert: Differenzierte Lipidanalysen im Liquor cerebrospinalis. VIII. Int. Kongr. Neurologie, Wien 1965, Proceedings, Bd. IV, 201 - 206

34) Schrappe, O., H.G. Stöckert, H. Wagenhoff und R. Scholz: Noch nicht veröffentlicht.

35) Selbach, H. und W. Trappe: Über die Anwendung einer neuen und einfachen Methode zur getrennten Bestimmung kleinster Mengen von reinem und verestertem Cholesterin im Liquor cerebrospinalis bei verschiedenen Nerven- und Geisteskrankheiten. Arch. Psychiat. 117, 341 - 549 (1944)

36) Sperry, W.M. und M. Webb: A Revision Of The Schoenheimer - Sperry Method For Cholesterol Determination. J. Biol. Chem. 187, 97 - 106 (1950)

37) Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch, Verlag Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg (1962)

38) Swahn, B., R. Brönnestam und S.J. Dencker: On The Origin Of The Lipoproteins In The Cerebrospinal Fluid. Neurology 11, 437 - 440 (1961)

39) Tichý, J.: Cholesterol und Cholesterolesterspiegel im Liquor bei Kranken mit Atherosklerose des Hirns. Psychiatrie (Leipzig) 16, 140 - 145 (1964)

40) Tourtellotte, W.W., R.N. DeJong und W.H. van Houten: A Study Of Lipids In The Cerebrospinal Fluid. I. The Historical Aspects. Univ. Michigan Med. Bull. 24, 66 - 99 (1958)

41) Tourtellotte, W.W., A.J. Vander, B.A. Skrentny und R.N. DeJong: A Study Of Lipids In The Cerebrospinal Fluid. II. The Determination Of Total Lipids. J. Lab. Clin. Med. 52, 481 - 490 (1958)

42) Tourtellotte, W.W., F.M. Parker und R.N. DeJong: A Study Of Lipids In The Cerebrospinal Fluid. III. The Determination Of Total Phospholipids. J. Lab. Clin. Med. 52, 491 - 495 (1958)

43) Tourtellotte, W.W., B.A. Skrentny und R.N. DeJong: A Study Of Lipids In The Cerebrospinal Fluid. IV. The Determination Of Free And Total Cholesterol. J. Lab. Clin. Med. 54, 197 - 206 (1959)

44) Tourtellotte, W.W.: A Study Of Lipids In The Cerebrospinal Fluid. VI. The Normal Lipid Profile. Neurology 9, 375 - 383 (1959)

45) Tourtellotte, W.W., A.F. Haerer, R.N. DeJong, S. Janich und K. Gustafson: Cerebrospinal Fluid Lipid Profiles In Various Diseases. IV. Int. Kongr. Neuropathol., München 1961, Proceedings, H. Jacob, Bd. 1, 46 - 58, Verlag G. Thieme, Stuttgart, 1962

46) Tourtellotte, W.W., R.J. Allen, A.F. Haerer und E.R. Bryan: A Study Of Lipids In Cerebrospinal Fluid And Serum. Arch. Neurol. 12, 300 - 310 (1965)

47) Tuna, N., J. Logothetis und R. Kammereck: The Fatty Acids Of The Human Cerebrospinal Fluid: Their Relation To The Serum Fatty Acids. A Study Using Gas-Liquid Chromatography. Neurology 13, 331 - 335 (1963)

48) Tuna, N., J. Logothetis und R. Kammereck: Fatty Acids In Spinal Fluid And Serum Of Patients With Demyelinating Disorders. Neurology 13, 381 - 385 (1963)

49) Weicker, J.: Adsorptionschromatographische Untersuchungen von Serumlipiden auf Kieselgelplatten. Klin. Wschr. 37, 763 - 767 (1959)

50) Zak, B., R.C. Dickenman, E.G. White, H. Burnett und P.J. Cherney: Rapid Estimation Of Free And Total Cholesterol. Am. J. Clin. Path. 24, 1307 - 1315 (1954)

51) Zilkha, K.J. und B. McArdle: The Phospholipid Composition Of Cerebrospinal Fluid In Diseases Associated With Demyelination. Quart. J. Med. 32, 79 - 97 (1963)

52) Zlatkis, A., B. Zak und A.J. Boyle: A New Method For The Direct Determination Of Serum Cholesterol. J. Lab. Clin. Med. 41, 486 - 492 (1953)

53) Zöllner, N. und K. Kirsch: Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipoide. Methodik und Identifizierung der Fraktionen. Z. ges. exp. Med. 134, 10 - 28 (1960)

54) Zöllner, N. und K. Kirsch: Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. Z. ges. exp. Med. 135, 545 - 561 (1962)

Lebenslauf

Am 9. Juni 1938 wurde ich, Holger Söhngen, als zweiter Sohn des Ingenieurs Hans Söhngen und dessen Ehefrau Gretel, geb. Schulz, in Erfurt geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit in Marburg bestand ich an der Martin-Luther-Schule in Marburg 1958 das Abitur.

Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg und bestand hier im April 1965 das Medizinische Staatsexamen.

In Bochum heiratete ich 1961 die Verwaltungsangestellte Hanne Tüchter. Dort wurde 1962 unser Sohn Hagen geboren.

Als Medizinalassistent war ich an der Universitäts-Nervenklinik Marburg, Direktor Prof. Dr. Jacob, der Medizinischen Universitätsklinik Marburg, Direktor Prof. Dr. Martini, der Universitäts-Frauenklinik Marburg, Direktor Prof. Dr. Buchholz, und an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg, Direktor Prof. Dr. Schwaiger, tätig.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Beckmann, Berendes, Bock, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Dölle, Exner, Gedigk, Golenhofen, Gross, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kaufmann, Lang, Linneweh, Lübbers, Mahr, Martini, Marx, Mattes, Maurath, du Mesnil, Müller, Neubauer, Niessing, Nieth, Oksche, Petry, Pirson, Sauer, Schadewaldt, Schleyer, Schmid, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Stein, Stender, Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle.